

## 2. ウイルス第二部

部長 脇田 隆字

### 概要

当部が対応するウイルスは主として消化器系疾患の原因ウイルスであり、A、B型肝炎ワクチン、不活化ポリオワクチン、弱毒生ロタワクチンを検定、検査対象としている。

第1室は下痢症ウイルスを担当するとともに、ポリオワクチン、ロタワクチンの検定、検査を担当する。本年度はポリオ単独不活化ワクチン（サノフィ：イモバックスポリオ）の出検は1件、沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ（セービン株）混合ワクチンDPT-sIPV、2種類（一般財団法人阪大微生物病研究会：テトラビック皮下注シリンジ、一般財団法人化学及血清療法研究所：クワトロバック皮下注シリンジ）は、中間段階3件、小分け製品12件の検定を行った。またサノフィ社のポリオ単独ワクチンを第一三共社のDPTと混合した沈降精製百日せき破傷風不活化ポリオ混合ワクチンDPT-cIPV（サノフィ第一三共：スクエアキッズ皮下注シリンジ）は、6件の出検があり、D抗原ELISAによる検定を実施した。ロタウイルスワクチンについてはGSK：ロタリックスが2件、MSD：ロタテックが9件出検され、検定を行った。ワクチン導入前後のロタウイルスの流行状況を把握するための研究、ロタウイルスの基礎研究が継続された。接種率は全国平均で50%を上回り、ワクチン導入によってロタウイルス重症入院症例が激減していると共に3月以降に見られるロタウイルスによる胃腸炎の流行のピークも低下しつつあることが明らかになった。

ノロウイルスに関しては、ノロウイルスワクチンシーズの開発研究が予定通りに進行している。流行予測プログラム開発のため全国の衛生研究所と協力しつつ、次世代シーケンサーを用いた下痢症ウイルス全ゲノム塩基配列解析と時系列分子系統解析が継続され、ゲノム全長データの蓄積が続いている。感染研ではレファレンスセンターとしての機能を良く果たすとともに、

カリシウイルスに関する基礎研究が進展している。未だに培養細胞で増殖させることのできないヒトノロウイルスに対して、慶応大学医学部との共同研究によりオルガノイドテクノロジーを導入し、ヒト腸管の試験管内培養の試みがスタートした。昨年度完成した、ヒト及びネズミ、ノロウイルスのリバースジェネティクスシステム、ゲノムワイドの遺伝子ノックアウトシステムであるCRISPER/Cas9システムを用いたノロウイルスのレセプター検索が稼働し始めた。ノロウイルス感受性細胞の構築を目指し、基盤研究が進行している。

第2室はWHO世界ポリオ根絶計画に参画している。WHOの指定をうけて、世界の特殊専門ラボとして、また西太平洋地域の指定ラボとして世界各地で分離されるポリオウイルスの性状解析を続けた。西太平洋地域では2000年以来ポリオフリーを維持してきた。西太平洋地域以外でも野生株ポリオ流行国が後3ヶ国となり、いよいよ世界的ポリオ根絶達成およびその後のOPV接種停止が視野に入ってきている。その一方、2015年9月から2016年にかけて、ラオスで1型ワクチン由来ポリオウイルスの大規模な流行が発生し、多くのAFP症例および接触者の糞便検体の検査を実施した。ワクチン接種率の低いハイリスク地域では、ワクチン由来ポリオウイルスの流行に、依然留意が必要とされる。糞便および環境水検体からポリオウイルスを直接検出・同定する手法の検討を進め、PVR-MB法およびECRA法によりポリオウイルスを迅速かつ高感度に検出する系を開発した。WHOは2014年12月にポリオウイルス病原体管理に関する新たなWHO行動指針(GAP III-2014)を公開した。我が国でも本指針に対応したポリオウイルス病原体管理を進める必要がある。また、JICAとの共催により実施した第25回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術としては

## ウイルス第二部

第 6 回目)ではポリオ流行国など各国からの参加者に講義および実習を実施した。国内エンテロレファレンスセンターとしてレファレンス活動、行政検査をおこなった。

エンテロウイルス 71 は手足口病の原因ウイルスであり、脳炎を併発することがある。エンテロウイルス 71 感染受容体、ヒト PSGL-1 に関する解析を進めている。非ヒト霊長類感染モデルにおける VP1-145 アミノ酸変異による多様性が、組織特異性、ウイルス適応性、および神経病原性に関与する事を明らかにした。抗エンテロウイルス薬候補化合物の標的として、宿主因子 PI4KB および OSBP を介した経路を特定し、抗エンテロウイルス活性の発現機序の解析を進めた。環境中のエンテロウイルスサーベイランスも進めている。

第 3 室及び第 4 室では B 型および C 型肝炎ウイルスの行政研究および基礎研究をおこなった。行政研究としては、肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎情報の収集とウイルス第二部のホームページにおいてデータベース構築および情報発信をおこなっている。検診で発見されるキャリアの治療導入が重要であり、肝炎ウイルス検査陽性者のフォローアップに関しては自治体や医療機関と連携して全国 17 の県、市町村にて約 1500 人の肝炎ウイルス検査陽性者をフォローアップしている。厚生労働省肝炎総合対策推進国民運動事業「知って、肝炎プロジェクト」と共同して、感染研の一般公開に元サッカー日本代表の岩本輝雄氏を招き、肝炎ウイルス検査の重要性等の広報活動を行った。基礎研究促進を目的に、肝炎研究基盤整備事業で肝炎セミナーを 5 回開催した。さらに、3 月には国内の肝炎ウイルス研究者による肝炎ウイルス研修会を開催し、若手研究者の育成に努めた。B 型肝炎ウイルスの研究では NTCP に関係するエントリー研究が進んだ。さらにウイルスの生活環に関わる宿主因子などの同定および解析が進んだ。C 型肝炎ウイルス研究も様々な研究課題が展開されているが、Direct Active Antiviral (DAA) による画期的な抗ウイルス療法の登場により、今後の研究の方向性を検討する時期

にある。より効果的で安価な治療法の開発、感染予防法の開発が求められる。

第 5 室の最重要課題は A 型及び B 型肝炎ワクチンの検定、検査である。本年度は A 型肝炎ワクチン 2 件、B 型肝炎ワクチン 20 件の検定をおこなった。B 型肝炎ワクチンは平成 28 年 10 月より定期接種化される。平成 28 年度以降は出検数の増加がみこまれており、部全体で検定増に備える必要がある。肝炎ワクチンは動物を用いた力価試験を実施しているが、試験管内力価試験への切り替えが望まれる。A 型肝炎ウイルスの研究では、2015 年の日本における A 型肝炎の流行状況の分子疫学的解析を行った。E 型肝炎ウイルスの研究では、レセプター探索研究とレプリコン細胞による抗ウイルス薬探索研究が進行している。また、全国における出荷豚の抗 HEV 抗体保有状況の調査を行い、養豚場での HEV 汚染状況について調べた。動物の E 型肝炎ウイルスではラット、フェレット、ラクダ、スunks などの解析が進んだ。

以下のような国際的技術協力をおこなった。

### 第 1 室

Dr. Rury Mega Wahyuni (インドネシア・アイルランガ大学) 平成 27 年 6 月 25 日～平成 27 年 7 月 11 日、下痢症ウイルスの検出、分子疫学の研修

Dr. Fangtzy Wu (台湾 CDC) <Taiwan CDC> 平成 28 年 2 月 17 日～平成 28 年 2 月 27 日、次世代シーケンスを用いた下痢症ウイルスのゲノム解析に関する研修。

### 第 5 室

周 顕鳳 (中国江西省 CDC) <日中笹川奨学金制度研究者> 平成 26 年 5 月～平成 27 年 4 月、E 型肝炎の分子生物学に関する研究

人事面では、定員削減の影響もあり新規の職員採用が困難な状況が続いている。様々な問題に対応するためにも新規職員の採用に努力していく。

平成 27 年 6 月に第一室に帰国予定であった村上耕介研究員が一年間の研究留学延長を行った。

片岡周子研究員は、平成 27 年 3 月退職後、AMED リ

## ウイルス第二部

サーチレジデントとして研究を継続していたが、平成 27 年 10 月より、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターに転出した。中村朋史研究官は、平成 27 年 12 月末をもって退職し、一般財団法人阪大微生物病研究会に転出した。

政木隆博主任研究官は平成 28 年 3 月末で退職し、慈恵医科大学に転出した。

## ウイルス第二部

<別> 検査業務	A型肝炎 11件
検定業務	E型肝炎 0件

### 第1室：

- ・ 4種混合ワクチンの力価試験（ラット免疫原性試験）14ロット
- ・ 3価混合不活化ポリオワクチン原液の不活化試験  
6ロット
- ・ イモバックスポリオの力価試験（D抗原量試験）  
1ロット
- ・ スクエアキッズの力価試験（D抗原量試験）  
7ロット
- ・ ロタリックス検定  
8ロット（H26/4-H27/3）（976948 doses）
- ・ ロタテック検定  
6ロット（H26/4-H27/3）（499399 doses）

### 第5室：

- ・ 乾燥組織培養不活化A型肝炎ワクチン 2ロット
- ・ 組換え沈降B型肝炎ワクチン（酵母由来） 20ロット
- ・ 次期参照沈降B型肝炎ワクチンの値付け 1回（3回繰り返しのうちの1回）

### 行政検査

#### 第1室

ノロウイルス・サポウイルス・ロタウイルス

合計7件

#### 第3室

体外診断薬承認前試験；コバス 6800/8800 システム  
HCV（ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社）

#### 第4室

平成27年度は兵庫県神戸市保健所から依頼された行政検査を行った。

### 第5室：

業績

調査・研究

I. 下痢症ウイルスに関する研究

(1) ヒトノロウイルスリバーシジェネティックシステム構築に関する研究

新生ウイルス粒子を産生可能なヒトノロウイルス GII/3 U201 株の完全長 cDNA pKS-U201F を用いたリバーシジェネティックシステムは、に GII.4 Saga-1 株、GII. P21-GII. 3 TCH04-577, Norwalk virus prototype NV68 のゲノム配列を挿入したクローンを作製し、ノロウイルス複製効率を比較検討した。HEK293T, COS0-7, Huh7 細胞を用いた場合、U201 は COS7 にて  $8 \times 10^4 / 10^6$  cells, Saga-1 は COS7 にて  $1.3 \times 10^3$  cells, TCH577 は Huh7 にて  $3.3 \times 10^2 / 10^6$  cells, NV68 は HEK293T にて  $2.6 \times 10^2 / 10^6$  cells の最高の新生ウイルス粒子産生量を示した。各株によって最高の新生ウイルス産生量を示す細胞株が異なっていた。しかし、HuNoV は、細胞内にゲノムを導入すれば、ヒトの細胞でもサルも細胞でも新生ウイルス粒子を産生可能であることが示された。HuNoV の感染増殖は、細胞への接着と侵入に関するレセプターに依存する可能性があることが示された。

[戸高玲子, 芳賀慧, 朴英斌, 中西章(国立長寿医療研究センター)片山和彦]

(2) ヒトエンテロイドを用いた HuNoV 増殖システムの構築

エンテロイドは、腸管生検から単離した腸管上皮幹細胞を培養することで得られる腸管上皮構造体である。ヒト腸管から作製したヒトエンテロイドへの HuNoV 感染実験を行った結果、GI. 1, GII. 3, GII. 4, GII. 17 の HuNoV が感染することを明らかにした。なお GI. 1, GII. 3, GII. 17 は、胆汁存在下でのみ感染可能であった。加熱、ガンマ線照射による HuNoV 不活化を評価したところ、いずれの方法でもウイルス増殖が抑えられた。本法は、これまで代替ウイルスの使用を余儀なくされていた HuNoV 不活化の直接的な評価、さらに HuNoV の感染メカニズムの理解に利用されることが期待される。

[Ettayebi K, Crawford SE, 村上耕介, Estes MK (ペイラー医科大学)]

(3) ノロウイルスを利用した経口ワクチン用ベクター作製の試み

経口ワクチンに特化した腸管特異的な導入が可能なベクターとしてヒトノロウイルスに加え、マウスノロウイルスを利用した遺伝子導入ベクターの作製を試みた。ヒトノロウイルスのリバーシジェネティックシステムをベースに構築した pKS-MNV-S7 プラスミドは、HEK293T 細胞にトランスフェクションすると感染性新生 MNV-S7 ウイルスを産生する。このプラスミドクローンの MNV-ORF3 (VP2) を定常的に発現する HEK293T 細胞を構築し、そこに VP2 部分を外来性遺伝子 (VENUS) に入れ替えた pKS-MNV-S7-ORF3VENUS をトランスフェクションした。VP2 はトランスに供給され、このシステムは ORF3 が VENUS に組み換わった感染性粒子を産生した。本年度は、さらにルシフェラーゼ遺伝子を導入することにも成功した。

[中西章(国立長寿医療研究センター)、戸高玲子、村上耕介、三木元博(デンカ生研)、脇田隆宇、片山和彦]

(4) ヒトノロウイルスのゲノム解析

2003 年以降 2016 年までの下痢症ウイルス感染患者便検体を全国の地方衛生研究所の協力により収集することにより、ウイルスの網羅的なゲノム全長の塩基配列の解析を次世代シーケンサー (MiSeq: イルミナ) を用いて行うプロジェクトが進行中である。この解析が進めば、ベイジアン法を用いた時系列分子系統解析により、流行株出現のメカニズムが明らかになる可能性がある。

[Doan Hai Yen, 芳賀慧、片山和彦、戸高玲子、木村博一(感染症疫学センター)、黒田誠(病原体ゲノム解析センター)、四宮博人(愛媛県衛生環境研究所)]

(5) GatVirusWeb 整備、病原体ゲノムライブラリーの構築

CaliciWeb をアップグレードした下痢症ウイルス全般を含むウイルスデータベース、情報共有サイトの GatVirusWeb を立ち上げ、国内外への塩基配列データ共有

化を進めた。さらに、本年度よりスタートした 2000 年以降の国内の下痢症ウイルスの全塩基配列解析結果をまとめ、データベース登録が進行中である。また、NoroNet typing tool へのリンクを行いサブデータベースとして、使い勝手の向上が図られた。今後、感染研病原体ゲノム解析センターとも連携を図り、ゲノムデータベースプロジェクトとの連携をすすめる。また、ロタウイルスタイプングツールの開発が進んでおり、島津株式会社と共にウェブに搭載可能な判定ソフトウェアの開発が進んでいる。

[三瀬敬治 (札幌医大)、Doan Hai Yen, 朴英斌、戸高玲子、藤井克樹、芳賀慧、片山和彦]

#### (6) ヒトノロウイルスの遺伝子型分別方法の国際統一にかかる研究

昨年度、我々は、ノロウイルスサイエンティフィックコミッティー (国際的に合意の得られた遺伝子型別を決定する組織) の一員として、この要望に答える ORF1 の RdRp コード領域と ORF2 の capsid コード領域を用いた遺伝子型分類法を確立した。昨年度は、本方法の国内への普及活動をノロウイルスレファレンスセンターを通じて行った。今年度は、遺伝子型表記方法を統一するため、感染研感染症疫学センターと協力しつつ、IASR に特集号を組み、遺伝子型表記方法に関する換算表を準備し、NESID、IASR、IDWR の遺伝子型表記を改訂するした。

[片山和彦、戸高玲子、Doan Hai Yen、芳賀慧、朴英斌、木村博一、木下一美、吉川昌江(感染症疫学センター)]

#### (7) ヒト腸管オルガノイド培養技術の導入

ヒトに感染するノロウイルス (HuNoV) は、ヒト腸管上皮では非常に効率よく増殖可能だが、株化培養細胞を用いて増殖させることはできない。慶応大学医学部の准教授である佐藤俊郎らは、ヒト腸管バイオプシより、幹細胞に刺激を与え、増殖培養させた後に、試験管内でヒト腸管の組織を再構築可能な培養システムの開発に成功した。我々は、佐藤准教授より技術指導を受け、腸管オルガノイドを導入をした。腸管オルガノイドは、順調に増殖を続け、ストックを作製することに成功した。現在、

オルガノイドのモノレイヤー化を試みている。

[片山和彦、戸高玲子、藤本陽、村上耕介、染谷雄一、石井孝司、佐藤悦郎、杉本真也 (慶応大学医学部)]

#### (8) ノロウイルスの網羅的 VLP および抗体の作製

ヒトノロウイルスは、感染モデル動物も存在せず、培養細胞で増殖させることもできず研究の進行が遅れている。ノロウイルスの研究、抗原抗体検出システムの開発などにウイルス様中空粒子 (VLP) と、それを用いて作製する抗血清は、研究用ツールとして極めて有用である。当部室では、VLP と抗血清の作製を継続し、パネルを維持している。本年度は 2 種類の新たなヒトノロウイルス VLP、抗血清を作製した。また、VLP ライブラリーを用いて、VLP 特異的モノクローナル抗体、GI もしくは GII をブロードレンジに認識するモノクローナル抗体の作製をの継続を行っている。

[三木元博 (デンカ生研)、杉本陽、朴英斌、戸高玲子、芳賀慧、染谷雄一、脇田隆宇、片山和彦]

#### (9) ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼの鋳型特異的 in vitro RNA 合成

昨年度に構築したノロウイルスの RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の in vitro RNA 転写活性を測定する系を用いて、ヒトノロウイルス RdRp の鋳型 RNA 特異性を調べた。その結果、鋳型 RNA: -鎖 3' 末端 100nt のうち、3' 末端 31nt (+鎖 5' 末端の 31nt の相補的配列) を欠失させると RdRp の転写活性が無くなり、この配列がヒトノロウイルス +鎖ゲノム RNA 合成に重要であることが示唆された。

[下池貴志、脇田隆宇]

#### (10) ノロウイルス RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の結晶構造解析と機能の解析

HuNoV と MNV の RdRp を大腸菌で発現させ、活性のある RdRp を得ることに成功した。昨年度から、RdRp の結晶化を試みたところ、HuNoV GII.3 U201 株、MNV-S7 株の結晶化に成功し、結晶構造を得た。立体構造を構築し、*in silico* での構造評価を行った結果、クローズドコンフィグレーションであることが判明した。ク

ローズドコンフィグレーションの RdRp は本来、RNA を抱き込んだ状態で形成される形状であるが、我々の RdRp には、いかなる RNA も結合していなかった。RdRp の形状、アミノ酸残基と RNA の結合様式を明らかにするため、RdRp に人工合成 RNA を反応させ、共結晶化を試みたが、成功しなかった。

[朴英斌、戸高玲子、芳賀慧、朴三用（横浜市立大学）、佐藤裕徳、横山勝（病原体ゲノム解析センター）]

(11) リバースジェネティクスシステムを利用し、ORF2 部分に Luciferase 遺伝子を導入したコンストラクトを作製し、RdRp の活性測定を試みた。HuNoV GII.3 U201 株、MNV-S7 株で、細胞内 RdRp 活性測定が可能となった。さらにコンストラクトを拡充するため、GII.4 Saga-1, GII.4/3 のキメラウイルスである TCH04-577, GI.1 NV68 のインフェクシャスクローンを用いて、同様のコンストラクトを作製した。

[朴英斌、戸高玲子、芳賀慧、朴三用（横浜市立大学）、佐藤裕徳、横山勝（病原体ゲノム解析センター）]

(12) ヒトノロウイルスの感染に関与する真のレセプターの探索法の検討

我々は、組織血液型抗原（HBGA）はヒトノロウイルス（HuNoV）の腸管粘膜層への接着には関与するが、細胞への結合には別の分子が関与していることを明らかにし、HuNoV の真のレセプターを探している。腸管上皮細胞のプロテオミクス解析により取得したレセプター候補分子のクローンを取得し、解析を進めている。また、リバースジェネティクスで作製した GFP 遺伝子内包ウイルスを用いて、その結合、細胞内発現を許容する株化培養細胞を探している。今年度は、腸管オルガノイドにノロウイルスを感染させ、感染細胞の 1 細胞トランスクリプトーム解析を行う準備を始めた。

[藤本陽、, 芳賀慧、戸高玲子、染谷雄一、片山和彦]

(13) ノロウイルス中和抗体認識部位の同定

ヒトノロウイルスは、抗体の中和効果を検出することができず、VLP で誘導した抗体を用いた研究成果により、

感染防御に関わる抗体を予測している。しかし、マウスノロウイルスは、我々が、マウスノロウイルス VLP の安定した作成に成功したことにより、中和活性のある抗血清および、モノクローナル抗体を得ることに成功した。昨年度より、中和活性のあるモノクローナル抗体のエピトープを検索しているが、エピトープは立体構造を有しており、変性条件下では抗体が VP1 に反応できなくなることが明らかになった。モノクローナル抗体の結合部位を明らかにするため、感染性 MNV に中和モノクローナル抗体の Fab 部分分離精製して結合させ、クライオ電子顕微鏡を用いて観察を行っている。[三木元博（デンカ生研）、戸高玲子、藤本陽、芳賀慧、村田和義（岡崎生理学研究所）、片山和彦]

(14) マウスノロウイルスレセプターの検索

マウスノロウイルス（MNV）感受性細胞である RAW 細胞は、マウスノロウイルスを感染させると、2-3 日後に死滅する。我々は、ゲノムワイドな遺伝子ノックアウトシステムである CRISPER/Cas9 システムを用いて、RAW 細胞の遺伝子をランダムにノックアウトした RAW 細胞ライブラリーを作製することとした。このランダムノックアウト RAW 細胞に MNV を感染させると、レセプターがノックアウトされた細胞のみが生き残るはずである。生き残った細胞に導入された gRNA を次世代シーケンサーで検出すれば、ノックアウトされたターゲット遺伝子を明らかにすることが可能である。そして、その遺伝子は、RAW の MNV 感受性を司る遺伝子、つまり、機能性レセプターの候補と成る。

[芳賀慧、藤本陽、戸高玲子、三木元博（デンカ生研）、村上耕介、中西章（国立長寿医療研究センター）、, 片山和彦]

(15) ノロウイルス RNA レプリコン遺伝子作成の試み

これまで培養細胞での増殖系が確立されていないノロウイルスの遺伝子及び粒子複製機構を明らかにするため、ノロウイルス遺伝子を RNA レプリコンとして持続的に維持できる細胞を確立することを目指した。ノロウイルスチバ株 ORF1 遺伝子下流に HCV IRES 支配

のネオマイシン（あるいはピューロマイシン）耐性遺伝子を配置し、in vitro で T7 RNA ポリメラーゼにより RNA を合成した。合成 RNA を Vero 細胞、あるいは、Alexander 細胞にエレクトロポレーションで導入し、薬剤による選択を行ったが、耐性細胞群を得ることはできなかった。

[染谷雄一]

(16) ヒトエンテロイドへの GII.3 HuNoV 感染に関与する胆汁成分に関する研究

GII.3 HuNoV は胆汁存在下でのみヒトエンテロイドへ感染可能である。GII.3 の感染に関与する胆汁成分を明らかにするため、様々な動物種の胆汁を検討したところ、ヒト以外に雌ブタ、仔ブタ、ウシの胆汁でも感染を促進することを明らかにした。また胆汁を加熱あるいはトリプシン処理しても感染に影響がなかったことから、感染に関与する胆汁成分はタンパク質ではないことが示唆された。今後は、感染に関与する胆汁成分を同定するとともに、そのメカニズムを明らかにしていく予定である。

[村上耕介, Tenge VR, Ettayebi K, Crawford SE, Estes MK (ベイラー医科大学)]

(17) ノロウイルス VLP の X 線結晶構造解析

ノロウイルスチバ株 (GI.4) の VLP を昆虫細胞で調製し、三次元結晶化を行った。高輝度光科学研究センターにおいて X 線結晶構造解析を実施し、直径 23 nm 粒子の X 線回折データを得ることができた。高解像度化を実施すると共に、直径 38nm 粒子の三次元結晶化を行う。

[染谷雄一、長谷川和也 (高輝度光科学研究センター)、熊坂崇 (高輝度光科学研究センター)]

(18) ノロウイルス VLP の電子顕微鏡単粒子解析

ノロウイルスチバ株 (GI.4) を除く、GI 株 (GI.1~GI.9) の VLP を昆虫細胞で調製するべく、VP1 タンパク質の遺伝子を有する組換えバキュロウイルスを調製した。いくつかの株に由来する VLP を理化学研究所ライフサイエンス技術基盤研究センターに供給し、電子顕微鏡単粒子解析を実施しているが、高解像度の電子顕微鏡像はまだ得られていない。

[染谷雄一、染谷友美 (理化学研究所)]

(18) 抗ノロウイルスヒト型モノクローナル抗体エピトープの決定

ノロウイルスチバ株 (GI.4) に反応性を有するヒト型モノクローナル抗体 3 種は藤田保健衛生大学医学部で得られた。それらのエピトープを決定するための抗原タンパク質を大量に得るため、チバ株 VP1 タンパク質を 5 つのサブドメイン (N 末、S ドメイン、PIN ドメイン、P2 ドメイン、PIC ドメイン) に分割し、それぞれの SUMO 融合タンパク質を大腸菌で発現させた。また、3 種の抗体を同様に大腸菌で大量に得るために、Strep タグ標識の抗体の合成遺伝子を pET22b ベクターに組み込んだ。今後、抗体の発現とエピトープ決定を行う。

[染谷雄一、守口匡子 (藤田保健衛生大学医学部)、谷口孝喜 (藤田保健衛生大学医学部)]

(19) ノロウイルスキャプシドタンパク質と血液型抗原との結合エネルギー解析

NoV の糖鎖認識の多様性を理解するため、X 線結晶構造解析と QM/MM 計算、分子動力学計算を組み合わせた複合シミュレーション手法を適用し、各種血液型抗原とキャプシドタンパク質との結合様式モデリング/解析を進めている。今年度は、自由エネルギー変化を成分分割する事で、両者の違いを比較した。タンパク質との相互作用以上に溶媒和の影響が大きくなっている事が示され、結合サイトにおけるアミノ酸置換が局所的な構造変化を誘発し、これに伴った水和構造の変化が糖鎖認識に強く影響を与えた事が確かめられた。

[白土東子、石田豊和 (産総研)、久保田智巳 (産総研)]



(20) ヒト型抗ノロウイルス抗体のウイルス-血液型抗原吸着阻害活性の検討

ヒト由来ファージ抗体ライブラリー12A2 から, GI.4 遺伝子型株, GII.4 遺伝子型株を抗原として単離してきたヒト型モノクローナル抗体が GI.4 遺伝子型株, GI.4 遺伝子型株だけでなく, GI.4, GII.4 遺伝子型株以外の株の血液型抗原へ結合に対しても阻害効果を示すことを昨年度までに明らかにしている. 今年度は, 異なるライブラリー 1A9 および 5A8 から GII.4 遺伝子型株を抗原として単離してきた抗体も同様の阻害効果を示すかどうかの確認を行った結果, ライブラリー12A2 から単離してきた抗体と同様に GII.4 遺伝子型株以外の株の血液型抗原へ結合に対しても阻害効果を示すことを明らかにした.

[白土東子, 守口匡子 (藤田保健衛生大学), 染谷雄一, 奥野良信 (阪大微研), 黒澤良和 (藤田保健衛生大学), 谷口孝喜 (藤田保健衛生大学) ]

(21) ノロウイルス感染性粒子構造の研究

我々はノロウイルスの感染性粒子構造を明らかにするため, MNV 感染性粒子と MNV-VLP の構造の比較, HuNoV の感染性粒子と VLP の構造の比較を構造生物学的手法と生化学的手法を用いて行っている. 本年度は, クライオ電子顕微鏡観察, クライオ位相差トモグラフィーを用いて MNV 感染性粒子構造と VLP の構造を解析をさらに進め, 8 Å を下回る解像度を得ることに成功した. 感染性粒子は粒子状の突起の隆起高が高く, シェルドメインが粒子内部に向かってくぼんでいるが, VLP は突起の隆起高が低く, シェルドメインが外部方向に隆起していることが分かった. P ドメインの位置関係が, MNV-1 と異なることも発見した.

[三木元博, 芳賀慧, 戸高玲子, 朴 英斌, 村田和義 (岡崎生理研), 片山和彦]

2. カリシウイルスに関する研究

(1) ウイルスプロテアーゼの基質を模倣した非ペプチド性化合物の抗ウイルス活性の評価

結合シミュレーションで選択したネコカリシウイルス (feline calicivirus: FCV) プロテアーゼの基質の構造特性をもち, 基質会合部位の空間に適合する化合物の *in vitro* での FCV プロテアーゼ活性阻害能とネコ由来腎臓細胞における FCV 増殖阻害能を確認した. 今後, ヒト由来のノロウイルスやサポウイルスが効率的に増殖可能となった場合, これらのウイルスプロテアーゼをターゲットにしたリード化合物の探索手法の 1 つとして有用と考えられる.

[岡智一郎, 横山勝 (病原体ゲノム解析センター), 高木弘隆 (バイオセーフティ管理室), 小島宏建, 長野哲雄, 岡部隆義 (東京大学創薬機構), 遠矢幸伸 (日大獣医), 佐藤 裕徳 (病原体ゲノム解析センター)]

3. ロタウイルスに関する研究

(1) わが国におけるロタウイルス分子疫学研究

ア) ロタウイルス検体の収集

わが国におけるロタウイルス流行株の変遷を調査するため, 2003年から2014年の間に全国の地方衛生研究所で採取され, 保存されていた下痢症患者の便検体を収集した. 結果的に北海道, 青森, 宮城, 栃木, 群馬, 埼玉, 神奈川, 静岡, 大阪, 広島, 山口, 愛媛, 熊本の全国13の都道府県から, A群ロタウイルス (RVA) 49 検体およびC群ロタウイルス (RVC) 8検体の合計57検体を収集することができた. RVCの検体が含まれていたのは北海道, 大阪, 広島, 山口の4箇所だった.

[藤井克樹, 団海燕, 片山和彦]

イ) ロタウイルスのフルゲノムシーケンシス解析

採取したロタウイルス 57 検体について, 次世代シーケンサーを行って全ゲノム配列を解析した. RVA の遺伝子型分布は Wa-like G1P[8]が 40%, DS-1-like G1P[8]が 4%, G2P[4]が 11%, G3P[8]が 22%, G9P[8]が 20%, G4P[8]が 2%であった. G3P[8]の 1 株は NSP2 が N2 タイプであり, DS-1 型ウイルスとリアソートメントを起こしていると考えられた. また, 非定型的遺伝子型構成である DS-1-like G1P[8]株 (G1-P[8]-I2-R2-C2-M2-

A2-N2-T2-E2-H2) が検出されたのは全て 2012 年以降の検体であった。

[藤井克樹、団海燕、片山和彦]

(2) 核酸自動電気泳動装置によるロタウイルスゲノムパターン解析法の確立

ロタウイルスの簡便・迅速な検査法の実用化を目指し、核酸自動電気泳動装置MultiNA (島津製作所) を用いたロタウイルスゲノムの電気泳動パターンを検証した。3 台の装置、12枚のチップを用いて再現性を確認したところ、波形データのフィッティング処理を行い、相関係数を算出することにより、実験間差の補正ができ、再現性の高い結果が得られることが判明した。また、リファレンス株(Wa-like G1P[8]、DS-1-like G1P[8]、G2P[4]、G3P[8]、G9P[8]およびRVC株)との相関係数を比較することにより、検体の遺伝子型を推定できる方法を見出した。

[藤井克樹、下池貴志、片山和彦]

(3) マウスロタウイルスを用いた宿主免疫応答の解析

ア) マウスロタウイルス接種後の腸管におけるBCR (B cell receptor) レパトア解析

マウスロタウイルスEW株をBALB/cマウスに経口接種して7日後に採取した回腸について、次世代シーケンサーによるBCRレパトア解析を行った (n=4)。その結果、ウイルス感染マウスではコントロールマウスと比較して、H鎖ではIGHV3-6、IGHV5-17、IGHV13-2においてIgM、IgG、IgAで共通して特徴的なCDR3の配列が認められた。また、L鎖ではIGKV6-32およびIGKV8-27において特徴的なCDR3の配列が認められた。特にL鎖 (Igκ) は偏りが大きく、4種類のCDR3配列の存在頻度が際立っていた。これらの配列がロタウイルス特異的抗体を構成していると考えられる。

[藤井克樹、片山和彦]

4. その他

(1) セービンワクチン力価試験およびD抗原量試験  
共通化に関する国際共同研究

WHO、NIBSCが中心となり、セービンワクチンの力価試験およびD抗原量試験を共通化するための国際共同研究が、セービンワクチン国際標準品制定を最終目的に進められている。その第一歩として、世界のいくつかのワクチン製造所が製造するセービンワクチン国際標準品候補品(7種)のD抗原量試験を実施した。得られたデータはNIBSCに提出し、現在NIBSCが総括を行っている。

[染谷雄一]

(2) Cohnの血漿分画法によるC型肝炎ウイルスの不活化の評価

血漿分画製剤はプール血漿をCohnエタノール分画法により製造される。これまで第IX因子製剤、フィブリノゲン製剤によるHCV感染事例が報告されて来たが、グロブリン、アルブミン製剤におけるHCV感染事故はほとんどない。この理由を明らかにするため昨年度に確立した実験室レベルでのCohnエタノール分画法を用いて調べた。その結果グロブリン分画(上清)を得るために行う17%エタノール処理により、HCVの感染性はグロブリンを含まない沈殿画分に分画されることが明らかとなった。

[下池貴志、野島清子<sup>\*</sup>、脇田隆宇、岡田義昭<sup>\*\*</sup> : 血液・安全性研究部, <sup>\*\*</sup>: 埼玉医科大学]

レファレンス業務

I. 標準品の作製

リアルタイムRT-PCR、通常のRT-PCRで標準品として使用する下痢症ウイルス遺伝子を組み込んだスタンダードプラスミドDNAを再調整し、検出・定量する際の標準品として新たに配布する準備を整えた。来年度には、各衛生研究所のブロック担当研究所に配布する予定。

[藤井克樹、片山和彦、木村博一(感染症疫学センター)]

## II. エンテロウイルスに関する研究

### 1. 実験室診断およびレファレンス活動

(1) 国内エンテロウイルスレファレンスセンターとしての活動

ア) レファレンスセンターとしてエンテロウイルス標準株と標準抗血清を保管し、要望に応じて地方衛生研究所等に配付した。2015年度は、エンテロウイルス抗血清パネル EP95 を 10 セット、単味抗血清 3 種類、細胞 3 種類を配布した。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 中村朋史, 清水博之]

イ) 感染症法改正に伴う病原体検査標準作業書ひな形検討

H26 年 11 月に成立した改正感染症法は H28 年 4 月に施行することを踏まえ、各種技術文書を通知にて発出することとなった。平成 27 年 8 月 11-12 日に、エンテロウイルスリファレンスセンター及びインフルエンザコアサポート地衛研の一部協力を得て、2 類及び 5 類病原体検査に関わる標準作業書のひな形作成のためのワークショップを開催。その後取りまとめを行い、「検査施設における病原体検査の業務管理要領」(健感発 1117 第 2 号平成 27 年 11 月 17 日)に反映させた。」

[秋場哲哉、千葉隆司、長島真美(東京都健安研セ)、加瀬哲男(大阪府公衛研)、川上千春(横浜市衛研)、調恒明(山口県保環セ)、高橋雅輝(岩手県保環セ)、滝澤剛則(富山県衛研)、皆川洋子、安井善宏(愛知県衛研)、濱崎光宏(福岡県保環研)、山下育孝(愛媛県衛環研) 吉田弘(感染研)]

ウ) 病原体検査における信頼性確保に関する検討

感染症法改正に伴い、病原体検査の信頼性確保の取り組みについて、WHO による実験室評価指標について国内の状況と比較を行い、応用可能性について検討した。今般の改正において地衛研にて実施する病原体検査は独自の取り組みにより信頼性を保証してゆくことが通知で示されており、外部精度管理調査は、検査の質保証には有効な指標であると認められる。他方、法

改正ではサーベイランス実施体制の見直しも含まれているため、検査施設の改善のみでは不十分であり、検体採取から検査、報告までの一連のフローの中で、信頼性を保証する必要がある。そのため、包括的な検査の質評価の指標開発を行う必要性が認められた。

[調恒明(山口県保環セ)、皆川洋子(愛知県衛研)、四宮博人(愛媛県衛環研)、岸本剛(埼玉県衛研) 北川和寛(福島県衛研)、高橋雅輝(岩手県保環セ)、児玉洋江(石川県保環セ)、濱崎光宏(福岡県保環研)、吉田弘(感染研)]

(2) 不活化ポリオワクチン(IPV)導入後の環境水サーベイランス(3年目)

わが国では 2012 年 9 月より IPV が導入された。これに伴い環境水調査によるポリオウイルスサーベイランスを 13 か所にて平成 25 (2013) 年度春より開始した。平成 26 年度は予算事業として 14 か所、調査研究 5 か所の計 19 か所の協力を得て調査を実施した。19 か所の下水利用人口は、延べ約 500 万人である。27 年度は事業として 16 か所、調査研究として 2 か所の地衛研の協力を得て調査を実施し、ポリオウイルスが検出されないことを確認している。引き続きポリオウイルスの監視を行っていく。

[板持雅恵(富山県衛研)、伊藤雅(愛知県衛研)、伊東愛梨(宮崎県衛環研)、小澤広規(横浜市衛研)、北川和寛(福島県衛研)、葛口剛(岐阜県保環研)、後藤明子(北海道衛研)、島あかり(佐賀県衛薬セ)、下野尚悦(和歌山県保環セ)、高橋雅輝(岩手県保環セ)、筒井理華(青森県保環セ)、中田恵子(大阪府公衛研)、中野守(奈良県保環セ)、西澤佳奈子(長野県保環研)、濱崎光宏(福岡県保環研)、堀田千恵美(千葉県衛研)、松岡保博(岡山県保環セ)、三好龍也(堺市衛研)、吉田弘(感染研)]

(3) ポリオを含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のための実験室診断技術集団研修(JICA共催)の開催

第 25 回ポリオ実験室診断技術研修会(ポリオ及び麻疹を含むワクチン予防可能疾患の世界的制御のため

の実験室診断技術としては第6回目)を実施した。感染研での研修期間は2016年1月18日～2月12日、研修参加者は、アフガニスタンから2名、フィジーから2名、モザンビークから1名、ナイジェリアから2名、パキスタンから2名、フィリピンから1名、スーダンから2名、ベトナムから2名の計14名であった。WHO ワクチン予防可能疾患実験室ネットワークにおける国家実験室に必要な技術習得のための実習および講義を実施した。ポリオ根絶および麻しん排除の現状と問題点を中心とした講義および討議を行った。

[清水博之, 吉田 弘, 有田峰太郎, 西村順裕, 和田純子, 脇田隆字]

#### (4) WHO Global Specialized Polio Laboratory (GSL) としての活動

ア) National Polio Laboratory が存在しないラオス・カンボジアの National Polio Laboratory として実験室診断を行った。本年度はカンボジア 171 検体およびラオス 601 検体の糞便からポリオウイルスの分離および同定を行った。カンボジアの糞便検体からポリオウイルス 2 型が検出されたが、ワクチンと同定された。2015 年 9 月に発症したラオスの AFP 症例由来糞便検体から 1 型ポリオウイルスが分離され、型内鑑別試験および VP1 領域の塩基配列解析により、分離株は Sabin 1 型との比較で 3.3%の変異を有する 1 型 VDPV と同定された。強化 AFP サーベイランスに由来するポリオウイルス分離株の解析により、2015 年 9 月から 2016 年 1 月にかけて発症した 11 例の AFP 症例が、1 型 VDPV によるポリオ症例であることが明らかとなった。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 中村朋史, 西村順裕, 和田純子, 清水博之]

#### イ) ラオスにおける 1 型ワクチン由来ポリオウイルスの流行

2015年9月7日に発症したAFP症例由来の糞便検体から1型ポリオウイルスが分離され、型内鑑別試験およびVP1領域の塩基配列解析により、分離株はSabin 1型と

の比較で3.3%の変異を有する1型VDPVと同定された。第一症例は検体採取直後に死亡したが、複数の接触者から分子系統学的関連性を有する1型VDPVが検出されたことから、地域集団における1型VDPVの長期的伝播が示唆された。強化AFPサーベイランスに由来するポリオウイルス分離株の解析により、2015年9月から2016年1月にかけて発症した11例のAFP症例が、1型VDPVによるポリオ症例であることが明らかとなった。11例のAFP症例は、8ヶ月齢から44歳(平均15歳)で、AFP症例の多くは不十分なポリオワクチン接種歴であった。第一症例が発生した地区(Bolikhambay Province)の2009年～2014年におけるOPV3回接種率は40～66%と報告されており、ラオスでは、長期にわたりポリオワクチン接種が不十分な民族集団が残されていた可能性が高い。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 中村朋史, 西村順裕, 和田純子, 清水博之, Phengta Vongphrachanh, Bouaphanh Khamphongphane, Bounthanom Sengkeopraseuth (Laos EPI), Walter William Schluter (WHO/WPRO), Siddhartha Sankar Datta (WHO/Laos)]

ウ) 2015 年 5 月 18 日～20 日にかけて、JICA 短期専門家として、ナイジェリアに 2 カ所ある WHO National Polio Laboratory のうち、イバダン・ポリオ実験室を訪問し、ポリオウイルス実験室診断および機器・備品の維持管理等に関する技術指導を実施した。

[清水博之]

エ) 2015 年 5 月 25 日～5 月 30 日に、WHO/WPRO(マニラ)において開催された The 5<sup>th</sup> Meeting on Vaccine-preventable Diseases Laboratory Networks および GAP III Poliovirus Biorisk Management Training に、WHO 短期専門家として参加し、WPRO ポリオ実験室ネットワークの現状と今後の課題に関する発表・情報交換を行うとともに、WHO ポリオウイルス病原体管理新基準(GAP III)に基づくバイオリスクマネジメント研修課程に参加した。

[清水博之, 伊木繁雄(バイオセーフティ管理室)]

オ) 2015 年 6 月 24-26 日に、WHO 本部 (ジュネーブ、

## ウイルス第二部

スイス)で開催された Meeting of the Ad Hoc Small Working Group on improving Polio Laboratory diagnostics および The 21th Informal Consultation of the Global Polio Laboratory Network に WHO 短期専門家として参加し、ポリオ実験室診断の精度管理の改善、環境サーベイランス手法の標準化、ポリオウイルス遺伝子診断法の技術的改良および精度管理試験等について検討を行った。感染研ウイルス二部からは、臨床検体からポリオウイルスを直接検出同定するための新たなアプローチに関する発表(Direct detection of polioviruses from AFP specimens and environmental samples)を行った。

[清水博之]

カ) 2015年7月5日-7月15日にベトナム・ホーチミン・パスツール研究所において開催された、JICA バイオセーフティワークショップおよび手足口病実験室診断技術研修会へ JICA 専門家として参加し、四カ所の基幹国立研究所、および、四カ所の省予防医療センターからの研修参加者に対して、手足口病実験室診断に必要とされるバイオセーフティ、手足口病および関連ウイルス実験室診断に関する講義および技術指導を実施した。また、各研究所および省予防医療センターにおける手足口病サーベイランスおよび実験室診断の現状について情報の共有化を図った。

[清水博之]

キ) WHO/WPRO および感染研国際協力室と協力し、2015年11月5日-11月12日に感染研戸山庁舎において開催された、TWENTY FIRST MEETING THE REGIONAL COMMISSION FOR THE CERTIFICATION OF POLIOMYELITIS ERADICATION IN THE WESTERN PACIFIC の開催準備および会議運営を担当した。また、日本ポリオ根絶会議委員長代理として、日本におけるポリオフリー状況およびポリオ流行のリスク、ラオスにおける VDPV 流行状況等に関する発表を行った。

[吉田 弘, 有田峰太郎, 中村朋史, 西村順裕, 和田純子, 清水博之, 内藤万佐子, 熊谷優子 (国際協力室)]

ク) 2016年2月22日~26日にかけて、JICA 短期専

門家として、ナイジェリアに2カ所ある WHO National Polio Laboratory のうち、イバダン・ポリオ実験室を訪問し、イバダン・ポリオ実験室において、安全キャビネットを含むポリオウイルス実験室診断に関わる主要機器・備品が適切に維持管理されていることを、同行した技術コンサルタントとともに確認し、スモークテスターを使用した安全キャビネットの日常点検について、技術スタッフに対する技術研修を実施した。国家ポリオ実験室技術スタッフ (イバダンおよびマイドゥグリ) を対象とした、日常的な機器・備品の維持管理に関する技術研修を実施した。

[清水博之]

ケ) 2016年3月8日-3月10日に Hotel President Wilson (ジュネーブ、スイス)で開催された Meeting of the Ad Hoc Small Working Group on improving Polio Laboratory diagnostics および Meeting of the Ad Hoc Small Working Group discussion on improving Polio Laboratory diagnostics に、WHO 短期専門家として参加し、Polio Endgame 後を見すえた GSL の役割と貢献についての情報提供を行った。とくに、世界ポリオ根絶計画の進展とワクチンポリシーの変更 (tOPV-bOPV スイッチ) にもなう実験室診断の技術的課題 (VDPV の再定義および2型ポリオウイルス検出法の改良、2型ポリオウイルス管理の厳格化への対応) および実験室ネットワークの役割分担について検討した。

[清水博之]

コ) 日本ポリオ根絶会議構成員として、Country Progress Report on Maintaining Polio-free Status in Japan for the 21<sup>th</sup> Regional Commission for the Certification of Poliomyelitis Eradication in the Western Pacific ドラフト作成と会議資料作成を担当した。

[清水博之]

## 2. WHO 西太平洋地域の 2014 年のポリオウイルス分離状況

### (1) WHO 西太平洋地域のポリオウイルス分離状況

2015 年にラオスおよびカンボジアから送付された AFP 症例由来の糞便検体 226 検体について、ウイルス分離検査及びポリオウイルスの型内株鑑別を行なった。ベトナム、カンボジアにおいて AFP 検体から分離されたポリオウイルスの型内鑑別あるいは塩基配列解析を行なった。野生株ポリオウイルスは検出されなかった。

2015 年 9 月 7 日に発症した AFP 症例由来の糞便検体から 1 型ポリオウイルスが分離され、型内鑑別試験および VP1 領域の塩基配列解析により、分離株は Sabin 1 型との比較で 3.3%の変異を有する 1 型 VDPV と同定された。第一症例は検体採取直後に死亡したが、複数の接触者から分子系統学的関連性を有する 1 型 VDPV が検出されたことから、地域集団における 1 型 VDPV の長期的伝播が示唆された。強化 AFP サーベイランスに由来するポリオウイルス分離株の解析により、2015 年 9 月から 2016 年 1 月にかけて発症した 11 例の AFP 症例が、1 型 VDPV によるポリオ症例であることが明らかとなった。広範な地域における AFP 症例および接触者の糞便検体から、分子系統学的関連性を有する計 26 株の 1 型 VDPV が検出されている。ラオスの 1 型 VDPV 株の遺伝子解析によると、すべての VDPV 株は分子系統学的関連性を有する一方、分離株間で比較的高い多様性を有しており、長期間かつ広範な VDPV 伝播が示唆される。VP1 以外のゲノム遺伝子領域の予備的解析によると、ラオスの 1 型 VDPV 株は、これまで報告された VDPV 株の多くで報告されている C 群エンテロウイルスとのゲノム遺伝子組換えは認められておらず、すべてのゲノム領域が Sabin1 株に由来する非組み換えウイルスである可能性が高い。

[清水博之、吉田弘、有田峰太郎、片岡周子、中村朋史、和田純子、脇田隆宇]

## 3. 世界ポリオ根絶計画に関わる研究

### (1) ポリオウイルスの直接検出法の開発

これまでに培養細胞と同程度もしくはより効率のよいポリオウイルス同定方法を開発することを目的として、便検体中のポリオウイルスを直接検出する系の開発を行ってきた。その中で、ポリオウイルスレセプターを付けた磁気ナノビーズ (PVR MB) を用いたポリオウイルス抽出法、やポリオウイルスゲノムのカプシド全領域を効率よく増幅する系 (ECRA 法) を開発してきた。これら 2 つの新規法は、これまでのアッセイにおける特異性および感度の問題を根本的に解決できる方法として注目されている。ECRA 法の効率をさらに上げることを目的とし、ECRA 法で得られた cDNA の回収方法の改善を検討した。PCR 産物精製段階を検討し、ECRA 法の産物を以前の方法の 5~10 倍の効率で効率よく回収できる条件を見出した。

[有田峰太郎]

### (2) ウイルス受容体特異性を応用した環境水からのポリオウイルス直接検出法の開発

細胞培養を経ずに高感度で環境中のポリオウイルス (PV) を検出する手法 (直接検出法) の開発・検討を行った。始めに、力価既知の PV をバッファーに添加した系で直接検出法の評価を行った。陰電化膜 (NCF) および PV レセプター結合型磁気ビーズ (PVR-MB) を用いて濃縮した PV から得た RNA を PV の型別同定法である Poliovirus intratypic differentiation Real-time RT-PCR (rRT-PCR ITD 法) にて解析した。しかしながら、細胞培養を用いる従来法と比較すると感度面で劣っていた。一方、得られた RNA からカプシド全領域特異的増幅法 (Arita, 2013) を用いて増幅した DNA 断片を次世代シーケンサー (MiSeq, illumina 社) で解析したところ、従来法に近い感度で PV を検出可能であった。また、パキスタンの環境検体を用いた試験でも種々の PV を検出可能であったことから、直接検出法の有用性が示された。

[中村朋史、有田峰太郎、Merja Roivainen (WHO/HQ), Sohail Zaidi (NIH/Pakistan), 清水博之]

### (3) PI4KB 阻害剤に耐性を示すポリオウイルス変異株

の解析

これまでの解析により、抗エンテロウイルス薬候補化合物の標的として、ホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ  $\beta$  (PI4KB) / オキシステロール結合タンパク (OSBP) 経路が同定され、この経路がウイルスの RNA 複製の場の形成に重要であることを示してきた。宿主の PI4KB/OSBP 阻害剤に対するエンテロウイルスの耐性変異はウイルスタンパク 3A の様々な箇所が生じることが知られていたが、これらの変異がどのように PI4KB/OSBP 阻害剤に対する耐性をもたらすのか不明であった。今回、PI4KB 阻害剤に対する耐性変異 (G5318A (3A-Ala70Thr) 変異) を持ったポリオウイルスの感染を解析し、この変異ウイルス株が感染した細胞では、ホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) が 1.3 倍程度上昇し、一方、3B タンパクの量が 0.7 倍程度に減っていることが明らかになった。

[有田峰太郎]

#### (4) ポリオウイルスタンパク発現による *trans*-complementation アッセイの構築

ホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ  $\beta$  (PI4KB) / オキシステロール結合タンパク (OSBP) 経路の阻害剤に対して耐性を示すポリオウイルスは、ウイルスタンパク 3A を高発現していることが見出されたが、3A タンパクの発現自体が PI4KB 阻害剤に対する耐性に関与しているかどうかを明らかにするために、ウイルスタンパクを異所性に高発現することで、PI4KB 阻害剤存在下におけるポリオウイルスの複製の阻害が解除されるかどうかを検討した。ウイルスタンパクを細胞に高発現させ、その細胞において PI4KB 阻害剤存在下でポリオウイルス感染を測定したところ、3A, 3AB タンパクを発現させた場合にのみ、ポリオウイルスの感染が上昇することが見出された。さらに、G5318A 変異を導入した 3A, 3AB タンパク質を発現させて、変異がない 3A, 3AB タンパクを発現させた細胞と比較したところ、3AB タンパクでのみ G5318A 変異の導入で PI4KB 阻害剤存在下におけるポリオウイルス感染が顕著に上昇した。このことから、G5318A 変異の直接の

標的は、3A タンパクではなく 3AB タンパクであることが示唆された。

[有田峰太郎]

#### (5) ウイルスタンパクの PI4KB 活性への影響の解析

エンテロウイルス感染細胞では、ホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ  $\beta$  (PI4KB) によりホスファチジルイノシトール 4-リン酸 (PI4P) が過剰に産生されていることが知られているが、ウイルス感染細胞の中でどのように PI4KB が活性化されているのか不明であった。今回、ポリオウイルスタンパクを発現・精製する系を構築し、*in vitro* における PI4KB 活性への直接の影響を解析することに成功した。その結果、ウイルスタンパク 2C, 2BC, 3AB, および 3D が、直接 *in vitro* の PI4KB 活性を上昇させることを見出した。3A タンパクは、PI4KB 活性に影響を与えなかった。G5318A 変異を導入した 3AB タンパクは、変異のない 3AB タンパクと同程度の PI4KB 活性上昇しかもたらさなかったため、G5318A 変異が PI4KB 活性の上昇に直接的に関与しているという証拠は得られなかった。これらの結果は、ウイルスタンパク質が直接的に PI4KB に作用し、活性化していることを示唆する。

[有田峰太郎]

#### (6) PI4KB 阻害剤に対するポリオウイルスの新規耐性変異の同定

これまで標的未知であった抗エンテロウイルス阻害剤 AN-22-A6 の解析を行った。その結果、これが新規の骨格を持つホスファチジルイノシトール 4-キナーゼ  $\beta$  (PI4KB) 阻害剤であることが判明した。AN-22-A6 に対する耐性を示すポリオウイルス株の中の C5151U (3A-Thr14Met) 変異および C5366U (3A-His86Tyr) 変異が、PI4KB 阻害剤に対する耐性変異であることを示し、これらがウイルスプロテアーゼによるウイルスタンパク 3AB の切断効率を上昇させることを見出した。さらに、これらの変異を 2 つ同時に持ったウイルス変異株では、3AB の切断効率および PI4KB に対する耐性が顕著に上昇することを見出した。また、G5318A

変異の結果と合わせて、PI4KB 阻害剤に対するポリオウイルスの耐性の程度と 3AB の切断効率に、正の相関があることが見出された。

[有田峰太郎]

#### 4. 日本におけるポリオフリーの維持に関わる研究

##### (1) 不活化ポリオワクチン累積接種率調査

全国から 5,000 人の 2 歳児を無作為に抽出し、居住する市区町村に四種混合ワクチン等を接種した月齢の調査を依頼し、回収された調査票をもとに全国累積接種率を推計した。今回調査対象となった 2 歳児は、全員、4 種混合ワクチン接種対象者なので、4 種混合ワクチンのみ調査を行った。2015 年の調査では、4 種混合ワクチン 1 回目累積接種率は、生後 12 ヶ月で 98.9%、生後 24 ヶ月で 99.3%であった。4 種混合ワクチン追加接種率は、生後 24 ヶ月で 83.3%であった。今回の調査では、OPV ならびに DPT 接種を受けた者はいなかった。

[崎山 弘 (崎山小児科)、清水博之]

##### (2) 不活化ポリオワクチン導入前後の予防接種状況および抗体保有状況に関する研究

わが国におけるポリオの定期予防接種には、従来、OPV が用いられてきたが、2012 年 9 月に単独不活化ポリオワクチンに切り替わり、同年 11 月からは 4 種混合ワクチンも使用可能となった。5 歳未満の乳幼児における IPV 含有ワクチン導入前後の予防接種状況ならびに抗体保有状況について検討を行った。2011～2015 年度の感染症流行予測調査をもとにした解析により、予防接種歴が不明であった者を除き、OPV または IPV 含有ワクチンの 1 回以上の接種歴があった者の割合 (1 回以上接種率) をみると、OPV の接種控えが問題となった 2011 年度は 0 歳で 45%、1 歳で 89%と低く、0～4 歳では 87%であった。翌 2012 年度も 0 歳で 67%、1 歳で 86%と低く、0～4 歳の 1 回以上接種率は 93%であった。IPV 含有ワクチンが定期接種に導入以降、2013～

2015 年度の 0 歳、1 歳の 1 回以上接種率は 95%以上と高く、0～4 歳でも 95%以上を示した。また、2011～2012 年度に 1 回以上接種率が低かった年齢層も 95%以上に上昇しており、接種控えによる影響は解消されたと考えられた。0～4 歳の接種歴が明らかな者における抗体保有状況 (中和抗体価 1:4 以上) をみると、2011 年度および 2012 年は 1 型・2 型に対して 95%未満の抗体保有率であり、3 型に対してはさらに 20 ポイント以上低かった。また、0 歳、1 歳では低い接種率を反映し、抗体保有率も低かった。1 回以上接種率が上昇し、IPV 含有ワクチンを受けた者の割合が増加した 2013 年度、2014 年度は 1 型・2 型に対して 95%以上であり、3 型との抗体保有率の差も小さくなった。2015 年度 (同 99%、100%、97%) は血清型間の差はほとんどなく、すべての血清型に対して 95%以上の抗体保有率であった。

[佐藤 弘, 多屋馨子 (感染症疫学センター)、清水博之]

##### (3) 原発性免疫不全症患者におけるワクチン由来ポリオウイルス排泄の検討

経口生ポリオウイルスワクチンは、まれにワクチン由来ポリオ麻痺 (VAPP) を起こすことがある。特に、原発性免疫不全症では、持続感染を起こし VAPP になる頻度が高いとされているが、日本では、これまでに調査されていない。そのため、原発性免疫不全症患者の糞便中にポリオウイルスが排泄されているか解析した。9 例の被験者に由来する糞便検体合計 26 検体について検査を行った。いずれの糞便検体もウイルス分離陰性であった。また、糞便検体から RNA を抽出し、ポリオウイルスを含むエンテロウイルス遺伝子を高感度に増殖することが出来る CODEHOP-snPCR 法によるエンテロウイルス遺伝子検出を試みたところ、すべての糞便検体において、ポリオウイルス遺伝子の増幅および検出は認められなかった。以上の結果より、今回検査を実施した被験者において、ワクチン株を含むポリオウイルスの持続感染は認められなかった。エンテロウイルス遺伝子を高感度に増殖することが出来る CODEHOP-s



nPCR法により、3名の異なる被験者より、3種類のエンテロウイルス遺伝子が検出された。塩基配列解析の結果、それぞれ、CV-A14、CV-B2およびCV-A16と同定された。今回検査を実施した被験者においては、エンテロウイルス持続感染は認められず、一過性エンテロウイルス感染であることが示唆された。

[野々山恵章 (防衛医大)、中村朋史、清水博之]

## 5. エンテロウイルスおよびその他腸管ウイルスに関する研究

### (1) NF449 類似化合物の RD 細胞に対する毒性

低分子化合物 NF449 は、おそらくエンテロウイルス 71 に結合することにより、エンテロウイルス 71 の RD 細胞への感染を阻害する。NF449 に類似した構造をもつ化合物 25 種類のエンテロウイルス 71 感染阻害効果を調べるにあたり、各化合物のもつ RD 細胞に対する細胞毒性を検討した。いずれの化合物もエンテロウイルス 71 の感染阻害を解析する濃度域においては目立った細胞障害性を示さなかった。したがって、各化合物の細胞への非特異的な影響を考慮することなく、エンテロウイルス 71 感染阻害活性を評価できることが明らかとなった。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

### (2) NF449 とエンテロウイルス 71 のドッキングモデル構築

NF449 に耐性を示すエンテロウイルス 71 はキャプシド蛋白質 VP1 の 98 番目のアミノ酸 (VP1-98) と 244 番目のアミノ酸 (VP1-244) に変異をもつことが報告されている。VP1-244 は陽性電荷をもつリシンであり、NF449 のもつ硫酸基と相互作用することが考えられた。この情報をもとに、分子シミュレーションプログラム MOE を用いてドッキングモデル構築を試みた。NF449 は様々な構造を取りうるが、VP1-244 のみ、あるいは VP1-244 と VP1-98 の両方と結合するモデルを構築することができた。

[西村順裕、清水博之、Jeffrey M. Bergelson (フィラデルフィア小児病院)]

### (3) 抗エンテロウイルス 71 モノクローナル抗体とエンテロウイルス 71 粒子との結合解析

当室の所有する抗エンテロウイルス 71 モノクローナル抗体について、エンテロウイルス 71 の成熟粒子 (キャプシド蛋白質 VP2,VP4 を含む) および空粒子 (キャプシド蛋白質 VP0 を含む) への結合性を検討した。その結果、抗エンテロウイルス 71 モノクローナル抗体は、①空粒子にのみ結合する抗体、②空粒子に強く結合するが、成熟粒子にも弱く結合する抗体、③空粒子にも成熟粒子にも強く結合する抗体、の 3 種類に大別されることが明らかとなった。エンテロウイルス 71 の成熟粒子と空粒子では立体構造が異なっていることが近年報告されている。特に①のモノクローナル抗体は空粒子構造の解析に有用と考えられた。

[西村順裕、清水博之]

### (4) カニクイザル感染モデルにおけるカプシドアミノ酸変異と病原性

EV71 カプシドタンパク VP1 の 145 番目のアミノ酸 (VP1-145) は、特異的受容体 PSGL-1 との結合性を規定する。EV71 の感染増殖・病原性発現における PSGL-1 受容体の役割を明らかにすることを目的とし、PSGL-1 結合および PSGL-1 非結合 EV71 株を用いたカニクイザル感染実験を行なった。EV71 は感染初期に VP1-145 に強い選択圧を受け、変異適応した VP1-145E を持つウイルスのみが効率よく増殖し、PSGL-1 非依存的に中枢組織に移行した。PSGL-1 非結合 EV71 株 (02363-KE) 接種群に由来する臨床検体では、VP1-98 における多様な quasi-species の存在が認められた。一方、PSGL-1 結合株および非結合株の感染組織中には、quasi-species は、ほとんど認められず、VP1-98/VP1-145E を有する EV71 variant が高頻度に認められた。PSGL-1 結合性 EV71 接種群のサル末梢血単核細胞から VP1-145G ウイルスが検出されたこと

から、細胞特異的な PSGL-1 依存的増殖の可能性が示唆された。PSGL-1 結合性 EV71 接種群の末梢血単核細胞検体では、同一の検体から VP1-145G および VP1-145E が検出され quasi-species の存在が認められた。以上の結果より、非ヒト霊長類感染モデルにおける VP1-145 アミノ酸変異による多様性が、組織特異性、ウイルス適応性、および病原性に関与する事を明らかにした。VP1-145 は、EV71 分離株間で多様性を有し、①PSGL-1 受容体特異性、②マウス感染モデルにおける病原性、③中和抗原性エピトープ、④低分子抗 EV71 化合物や中和抗体の結合、⑤サルモデルにおける適応変異と神経病原性発現、⑤ヒト EV71 感染重篤化への関与の可能性等、in vitro および in vivo における、さまざまなウイルス表現型に関与することが明らかとなった。

[片岡周子(北海道大学)、清水博之、西村順裕、網康至(動物管理室)、鈴木忠樹、小谷治(病原体ゲノム解析研究センター)、岩田奈織子、永田典代(感染病理部)]

#### (5) PSGL-1 結合性エンテロウイルス 71 株のカニクイザルにおける病原性の解析

我々は EV71 特異的受容体として PSGL-1 を同定し、PSGL-1 結合性 EV71 株は PSGL-1 を介して T 細胞に感染することを培養細胞レベルで明らかにした。PSGL-1 結合性 EV71 株は二種類に分類される。ウイルスキャプシド蛋白質 VP1 の 145 番目のアミノ酸がグリシン (VP1-145G) の株と、グルタミン (VP1-145Q) の株である。このうち後者 VP1-145Q のウイルスが重症の EV71 感染者から高頻度に分離されるという報告もある。これまで我々は、カニクイザル EV71 感染モデルを確立し、EV71 臨床分離株の病原性の比較・免疫原性等の研究を進めてきた。EV71-02363 株を基に作製した VP1-145G あるいは VP1-145E (E の場合は PSGL-1 非結合株である) をもつウイルスによるカニクイザル感染実験では、両群とも重篤な症状を示さなかった。本研究では VP1-145Q のウイルス (EV71-02363 株を基に作製) を用いて、VP1-145 のアミノ酸の違いが PSGL-1

結合性ウイルスの病原性に影響するかどうかを、ヒト感染に近いカニクイザル EV71 感染モデルを用いて in vivo で解析する。病原性発現、ウイルス増殖、病変の局在等について比較し、PSGL-1 依存性のウイルスが起こす病原性発現機構について、VP1-145 のアミノ酸の違いによる影響を詳細に解析する。

[西村順裕、清水博之、片岡周子、網康至(動物管理室)、岩田奈織子、永田典代(感染病理部)]

#### (6) 北部ベトナムにおける手足口病の疫学とウイルス遺伝子解析

ベトナムでは、近年、死亡例・重症例を含む手足口病あるいはエンテロウイルス 71 (EV71) 感染症の流行が報告されている。2011-2012 年には、ベトナム全土で、死亡例を含む多くの重症例を伴う大規模な手足口病流行が発生し、公衆衛生上の大きな問題となっている。本年度は、おもに、2015 年に北部ベトナムで報告された手足口病症例の実験室診断を行い、EV71 を含めた原因ウイルスの解析を行った。手足口病症例由来臨床検体から RNA を抽出し、汎エンテロウイルス RT-PCR およびマルチプレックス・リアルタイム RT-PCR (EV71, CVA6, CVA10, CVA16) により、エンテロウイルスの検出・同定を行った。ベトナム北部では、2011-2012 年は EV71 が高頻度で検出されていたが、2013 年は、日本を含む他のアジア諸国同様 CVA6 が比較的多く検出された。2014 年は、CVA16 が高頻度に検出されたが、2015 年は、CVA6 および EV71 が北部ベトナムにおける手足口病の主要な原因ウイルスであった。EV71 分離株の分子疫学的解析によると、2013 年には Sub-genogroup B5 の検出頻度が増加し、2014-2015 年も引き続き、Sub-genogroup B5 が北部ベトナムにおける主要な EV71 遺伝子型であった。

[中村朋史、清水博之、片岡周子(北海道大学)、Tran Thi Nguyen Hoa、Nguyen Thi Hien Thanh (NIHE)]

#### (7) エンテロウイルス 71 抗血清国際標準品樹立のための国際共同研究

近年、東アジア地域を中心とした地域で、重症中枢神経合併症を伴う大規模な手足口病流行が発生し、小児の重症例・死亡例が多発したことから、公衆衛生上大きな問題となっている。手足口病重症例の主要な原因ウイルスは、EV71であることから、アジア諸国では現在、EV71ワクチン開発が積極的に進められている。臨床試験における有効性・安全性の結果を踏まえ、2015年12月、中国で、世界初の不活化エンテロウイルス71ワクチンが承認され、中国市場に導入された。不活化EV71ワクチンの品質管理およびEV71血清疫学解析の国際的標準化のために、EV71中和試験に用いるEV71抗血清国際標準品の樹立が必要とされている。そのため、The WHO collaborative study to establish the 1st International Standard for anti-EV71 serum に参加し、NIBSCから提供される13種類の抗血清(ヒトプール血清等)とEV71 C4 523 株を用いたEV71中和抗体価測定を実施した。その結果、EV71抗血清国際標準品候補のうち、14/140が the 1<sup>st</sup> IS for anti-EV71 serum (Human)に選定された。

[西村順裕、片岡周子、中村朋史、清水博之]

#### (8) エンテロウイルス D68 (EV-D68) 流行対応と実験室診断体制の整備

EV-D68 は *Enterovirus D* に分類されるが、温度感受性および酸耐性等のウイルス学的性状から、EV-D68 はライノウイルス同様、主として呼吸器感染症に関与するユニークなエンテロウイルスであると考えられている。2014年、米国で、EV-D68 感染症の広範な流行が発生し、呼吸器感染症だけでなく、急性弛緩性脊髄炎 (Acute Flaccid Myelitis: AFM) ・急性弛緩性麻痺 (Acute Flaccid Paralysis: AFP) や脳神経障害等、中枢神経疾患合併症症例から EV-D68 が検出されたことから、エンテロウイルスによる再興感染症として注目を集めた。しかし、EV-D68 の疫学および病原性については、いまだ不明な点が多く残されており、EV-D68 感染と AFM・AFP を含む中枢神経疾患発症との関連性について、現在も慎重な検討が進められている。日本でも、2015年8月以降、病原微生物検出情報における

EV-D68 検出数の増加が認められ、重症例を含む呼吸器感染症由来検体からの EV-D68 検出事例が相次いで報告された。EV-D68 検出数は、2015年9月をピークに急増したが、EV-D68 感染症流行とほぼ同時期に、小児を中心とした AFP 症例の報告が相次ぎ、一部 AFP 症例から EV-D68 が検出された。そのため、厚生労働省は、2015年10月21日付の事務連絡として、「急性弛緩性麻痺 (AFP) を認める症例の実態把握について (協力依頼)」を发出し、積極的疫学調査の枠組みによる AFP 症例報告および病原体検査による、原因究明のための調査を進めた。感染研では、EV-D68 特異的リアルタイム PCR 法が、他のエンテロウイルス遺伝子検出法と比較して感度が高いという結果を得、EV-D68 以外の病原体の関与の可能性も含めた検査体制の整備を進めた。髄液や血液からの EV-D68 検出頻度は低く、多くの EV-D68 感染事例では、呼吸器由来検体から EV-D68 遺伝子が検出された。

[多屋馨子、花岡希、藤本嗣人(感染症疫学センター)、清水博之]

#### (9) 我が国のサーベイランスデータからみるエンテロウイルス D68 検出症例

全国の地方衛生研究所 (地衛研) において行われた病原体検査の結果が、感染症サーベイランスシステムの病原体検出情報に報告されている。病原体検出情報を基にエンテロウイルス D68 型 (EV-D68) の流行実態の把握を試みた。2000年から2015年までに報告された EV-D68 検出例の年齢群、診断名等について特徴を調べた。2005年以降、34都府県から451例(男性54%)が報告された。2009年までは年間に数例程度であったが、2010年129例、2013年122例、2015年は11月19日現在で171例の報告があった(その後2015年の報告数は258例に増加)。検体採取月別では、どの年も9月をピークに夏から秋にかけて検出が増加していた。年齢中央値は3歳で、1歳を中心に0-4歳群が最も多く、5-9歳群が続いた。主な診断名は、下気道炎、上気道炎、気管支喘息など呼吸器疾患が大半であった。急性脳炎、心肺停止、急性片麻痺、末梢神経麻痺など

の症例も報告されていた。74%は発熱を呈していた。EV-D68 を検出した検体の大多数(97%)は咽頭拭い液であったが、糞便、血液、等からの検出例の報告もあった。2014年に米国で呼吸器疾患のアウトブレイクを起こした EV-D68 は過去に日本でも流行していたことが示唆された。

[木下一美、砂川富正、多屋馨子、大石和徳（感染症疫学センター）、清水博之]

## 6. ポリオウイルスのバイオセーフティ及びバイオセキュリティシステムに関する調査研究

### (1) WHO ポリオウイルス病原体バイオリスク管理行動計画(GAPIII)について

2016年6月現在、1型野生株ポリオウイルス流行国は、パキスタンおよびアフガニスタンに局限しており、WHO は、世界ポリオ根絶計画の早期達成を目指している。WHO Polio Eradication and Endgame Strategic Plan 2013-2018 では、世界ポリオ根絶達成の要件のひとつとして、ポリオウイルス取扱い施設から地域社会へのポリオウイルス再侵入のリスクを最小限とするための、ポリオウイルスの安全な取扱いと封じ込め活動の徹底を挙げている。そのため、WHO は、2014年12月に、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する世界的行動計画改訂第三版である WHO Global Action Plan to minimize poliovirus facility-associated risk after type-specific eradication of wild polioviruses and sequential cessation of OPV use(野生株ポリオウイルスの型特異的根絶および経口ポリオワクチン使用の段階的停止後におけるポリオウイルス取扱い施設関連リスクを最小化するための WHO 世界的行動計画; GAPIII)を公開し、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理の厳格化を求めている。GAPIII は、ポリオ根絶最終段階におけるポリオウイルスのバイオリスク管理標準について、具体的かつ詳細に示した行動計画であり、世界中のポリオウイルス取扱い施設を、診断・研究・ワクチン製造等に関わる必須な機能を遂行するために必要とされ

る最小限の認証された施設(Essential Poliovirus Facility)に限定し、これらの施設では、GAPIII に示されたバイオリスク管理標準に準じてポリオウイルスを取扱うことを求めている。OPV 使用国で、2016年4～5月に実施された trivalent OPV 接種の世界的停止にともない、Essential Poliovirus Facility 以外の施設では、2016年7月末までに、不必要な2型ポリオウイルス感染性材料を廃棄する必要がある。ワクチン株(Sabin 2株)を含む2型ポリオウイルス感染性材料を保有する施設では、GAPIII に準じたポリオウイルス病原体バイオリスク管理に対応する必要がある。そのため、厚労省結核感染症課、日本ポリオ根絶会議等と協力して、WHO GAPIII によるポリオウイルス病原体バイオリスク管理体制整備に向けた周知と国内対応を進めた。

[清水博之]

### (2) WHO ポリオウイルス病原体バイオリスク管理行動計画(GAPIII)国内対応活動

ポリオ根絶最終段階に向けたポリオワクチン戦略の一環として、2016年4月のbivalent OPV導入後は、2型ワクチン株(Sabin2/OPV2株)についても、GAPIIIに基づく病原体管理の対象となる。標準株として広く用いられているワクチン株も病原体管理の対象となることから、ポリオウイルス検査・研究施設だけでなく、より広範な医学生物学施設へのポリオウイルス病原体廃棄・管理の必要性についての周知が必要とされる。そのため、National Poliovirus Containment Coordinator として、ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する周知を進めるため、GAPIIIの和訳版を作成し、内容について整理するとともにGAPIIIを反映したポリオウイルス病原体バイオリスク管理国内ガイドラインの策定を進めた。また、sIPVワーキンググループを組織し、sIPV製造施設におけるポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関する技術的情報交換と2型ポリオウイルス感染性材料を使用しないsIPV品質管理方法の検討を開始した。2型ポリオウイルスを用いたIPV検定業務および品質管理研究のため、GAPIIIに基づ

く poliovirus-essential facility として、感染研村山  
庁舎BSL3実験室の整備を行った。

[染谷雄一、西村順裕、有田峰太郎、吉田弘、片山和  
彦、清水博之、脇田隆字]

(3) WHO ポリオ実験室ネットワーク DVD を用いたバイ  
オセーフティ教育訓練

WHO本部ポリオ実験室ネットワーク事務局で作成した  
ポリオ実験室バイオセーフティ教育訓練用DVDを、外国  
人研修生に対するバイオセーフティ教育訓練に使用し  
た。WHOポリオ実験室教育訓練DVDは、実験室のバイ  
オセーフティ、機器の維持管理、バイオセーフティ以外  
の実験室安全管理、実験室のアレンジメント等、実験  
室・検査室の運用・安全管理・教育訓練に関する具体  
的な事例が取り上げられており、病原体を取扱う実験  
室の安全管理の全体像を理解するうえで有用な教育訓  
練資料である。外国人研修生を対象としたJICA集団研  
修において、WHOバイオセーフティ教育訓練用DVDを用  
いたバイオセーフティ教育訓練を実施した。WHOポリ  
オ実験室教育訓練DVDは、国際的に標準化されたバイ  
オセーフティ教育訓練資料のひとつとして、ポリオ実験  
室のみならず、臨床検体や病原体を取扱う国内外の実  
験室・検査室における教育研修への活用が期待できる。

[伊木繁雄(バイオセーフティ管理室)、清水博之]

### III. 肝炎ウイルスに関する研究

#### 1. A型肝炎ウイルス(HAV)に関する研究

(1) 2015年のA型肝炎流行状況の分子疫学的解析

2015年のA型肝炎は242例の報告があった。本年はそ  
のうち37例の構造/非構造ジャンクション領域の配列  
を決定した。30例(81%)がIA、5例(14%)がIB、2  
例(5%)がIIIAであった。秋田県で家族内感染と思わ  
れる事例が発生し、5名が感染し4名が発症、1名が死  
亡した。2例の配列を決定することができ、いずれも  
IBで同一の配列であった。

[石井孝司、清原知子、吉崎佐矢香、佐藤知子、\*島

田智恵、\*中村奈緒美、\*砂川富正、\*\*野田 衛、脇田  
隆字(\*感染症情報センター、\*\*国立衛研食品衛生管  
理部)、他31地方衛生研究所との共同研究]

(2) 2002年のタイにおけるA型肝炎集団発生事例の解  
析

2002年にバンコク近郊で発生したA型肝炎の集団発  
生事例について、25名の患者血清が保存されており、  
HAVゲノム抽出を行ってウイルス遺伝子配列の解析  
を行ったところ、すべて同一で東南アジアでは極めて  
稀な genotype IBであった。1検体から全長配列を決定  
することができた。

[\*Kriengsak Ruchusatwat、\*Chitlada Utaipiboon、  
\*Chawatesan Namwat、\*Rungreung Kijphati、\*Naiyana  
Wattanasri、\*Piyanit Tharmaphornpilas、\*\*武田直  
和、石井孝司(\*タイ国立予防衛生研究所、\*\*大阪大学  
微生物病研究所・日本—タイ感染症共同研究センタ  
ー)]

(3) Havrixの相対力価

海外で広く使用されているGSK社のA型肝炎ワクチ  
ンHavrix (Havrix

1440, Lot: AHAVB824AK) について in vivo 相対力価  
試験を行った。方法はA型肝炎ワクチンの国家検定力  
価試験に従った。国内参照A型肝炎ワクチンに対する  
Havrixの相対力価は1.045(95%信頼区間0.502~  
1.724)であった。in vivo 相対力価において、Havrix  
は合格基準の力価1以上に達しているものの、日本の  
ワクチンよりは力価が低かった。

A型肝炎ワクチンは各メーカーで製剤の特性(抗原特  
異性、アジュバントの有無、アジュバント除去後の抗  
原回収率等)が異なり、共通基準によるメーカー間の  
抗原性比較は難しい。一方、マウスに対する抗体誘導  
能(in vivo 相対力価試験)は抗原特異性や抗原回収  
率の影響による部分が無いあるいは少なく、メーカー  
間の比較が可能である。国内未承認ワクチンと日本の  
承認ワクチンを比較検討することは、多様なニーズに  
対するワクチン接種計画を立てる際に有用である。

[清原知子、佐藤知子、李天成、塩田智之、吉崎佐矢香、石井孝司、脇田隆字]

## 2. B型肝炎ウイルス (HBV) に関する研究

### (1) B型肝炎ウイルスのエンテカビル投与中に再燃した症例から得られた耐性株の解析

エンテカビル投与中に HBV DNA が再上昇した症例の患者血清中に rtV173L/rtL180M/rtM204V の変異を有する株を確認した。これらの 3 つの変異を有する株、rtL180M/rtM204V 変異のみを有する株、変異を持たないコンセンサス株をもとに 1.4 倍長の HBV コンストラクトを構築し培養細胞に導入し RTD-PCR にてエンテカビル感受性の評価を行った。rtL180M/rtM204V の変異を有する株、rtV173L/rtL180M/rtM204V の変異を有する株は両方ともエンテカビルに耐性を示した。どちらの株も変異を持たない株と比較し EC50 は高価を示したが、rtL180M/rtM204V に rtV173L が加わることによりウイルスの複製が上昇することが明らかとなった。[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

### (2) B型肝炎ウイルスのエンテカビル長期投与中に再燃をきたした症例の解析

エンテカビル投与中 6.8 年後に HBV DNA の再上昇を認めた症例の患者血清中に rtL180Q/rtM204V/rtN238H/rtL269I の変異を有する HBV 株を確認した。これら 4 つの変異を有する株とこれらの変異を持たないコンセンサス株をもとに 1.4 倍長の HBV コンストラクトを構築し培養細胞に導入し RTD-PCR にてエンテカビル感受性の評価を行った。これら 4 つ変異を有する株は変異を持たない株と比較し、エンテカビル感受性が不良であり EC50 は約 60 倍高く、これらの変異はエンテカビルに耐性であることが明らかとなった。[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

### (3) エンテカビル耐性症例から得られた耐性変異の薬

## 剤感受性評価

エンテカビル耐性が確認された rtL180Q/rtM204V/N238H/L269I の変異を有する株のうち、これまでに報告のない N238H/L269I について検討した。ラミブジン耐性変異である rtL180Q/rtM204V に rtN238H または L269I を入れたコンストラクトを作成し培養細胞に導入し RTD-PCR にてエンテカビル感受性の評価を行った。rtL180Q/rtM204V の変異のみを有する株は変異を持たない株と比較し EC50 は約 4 倍であり、rtN238H が加わることでは EC50 に変化はなかったが、rtL269I が加わることにより EC50 は約 60 倍高くなることが明らかとなった。

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

### (4) HBV エンテカビル耐性株のテノホビル感受性評価

エンテカビル耐性が確認された変異 rtV173L/rtL180M/rtM204V および rtL180Q/rtM204V/N238H/L269I についてテノホビルに対する感受性を検討した。これらの変異を有するコンストラクトと変異を持たないコンストラクトを培養細胞に導入し RTD-PCR にてテノホビル感受性の評価を行った。これらの変異を有する株と変異を持たない株はともにテノホビル感受性を示し、テノホビルに対する EC50 は同等であった。

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏(東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

### (5) B型肝炎急性肝炎症例における HBs 領域のアミノ酸変異の検討

B型肝炎急性肝炎症例 128 例 (Genotype ; A 66 例, B 19 例, C 43 例) の中和エピトープとなる S 領域のアミノ酸変異を検討した。128 例中、hydrophilic region (aa 110-160) では 13 例 (10.2%), a determinant 領域 (aa 124-147) では 9 例 (7.0%) に変異を認めた。ワクチンエスケープ変異として知られる T126S と、これまでに報告のない T131P/A, M133L, F134Y, P135H を認めた。これらはオーバーラップする RT 領域の変異を伴うものが認められたが、核酸アナログ耐性変異とし

て知られている変異は認めなかった。

[山田典栄, 杉山隆一, 四柳宏 (東京大学), 脇田隆字, 加藤孝宣]

(6) HBV 感染がNK細胞により誘導されるアポトーシスの感受性に与える影響の解析

HBV の複製モデル導入細胞に NK 細胞を加える事で, HBV 複製がNK細胞により誘導されるアポトーシスの感受性に与える影響を解析した. 遺伝子型が異なるHBV 株8株について検討を行った. これらの複製コンストラクトをHepG2細胞に導入し, その後NK細胞を加えアポトーシスを誘導した. その結果, 遺伝子型 Bj 株の導入細胞では高く遺伝子型 A 株の導入細胞では低いアポトーシス感受性を示した. これらのアポトーシス感受性に与える影響の差は, HBV 株が得られた症例の臨床像と関連している可能性が考えられた.

[椎名正明 (新百合ヶ丘総合病院), 杉山奈央, 山田典栄, 杉山隆一, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(7) HBV 検体パネルを用いた HBV DNA 定量系の性能評価

献血検体を用いて整備したHBV陽性および陰性検体パネルを用いて, HBV DNA 定量用体外診断薬2種類の性能評価を行った. HBV 陰性検体パネルとして整備した53検体は, どちらの診断薬での測定においても陰性であった. HBV 陽性検体パネルとして整備した80検体を測定では, 検出感度にまさるキットで, より多くの検体が定量可能であった. 次にこれらのキットで定量されたHBV DNA 量の相関について検討を行った. その結果, 両者のHBV DNA 量の測定値に高い相関を認め, 回帰直線式の傾きもほぼ1に近い値であった. 遺伝子型によるこの相関への影響は認めなかった.

[百瀬暖佳, 松岡佐保子, 浜口功 (血液・安全性研究部), 杉山奈央, 山田典栄, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(8) HBV 検体パネルを用いた HBs 抗原測定系の性能評価

HBV 陽性および陰性検体パネルを用いて, HBs 抗原測

定用体外診断薬の性能評価を行った. HBV 陽性検体パネルの測定では, 一部のキットで測定感度以下となる検体があったが, これはキットの検出感度に依るものと考えられた. HBV 陰性検体パネルを用いた評価ではすべての試薬で陰性の結果が得られた. HBs 抗原定量用試薬による HBV 陽性検体パネルの測定では, 相互に測定値の相関の低い組み合わせがあることが明らかとなった. HBV の遺伝子型別の相関の検討により, これらの定量系の測定値は遺伝子型に強く影響を受けていることが明らかとなった.

[百瀬暖佳, 松岡佐保子, 浜口功 (血液・安全性研究部), 杉山奈央, 山田典栄, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(9) Non-Stop RNA decay targets HBV X mRNA for degradation at the RNA exosome complex.

Hepatitis B virus (HBV) is a stealth virus, minimally inducing the Interferon system required for efficient induction of both innate and adaptive immune responses. However, 90% of acutely infected adults can clear the virus, suggesting the presence of other, interferon-independent pathways leading to viral clearance. Given the known ability of helicases to bind viral nucleic acids, we performed a functional screening assay to identify helicases that regulate HBV replication. We identified the superkiller viralicidic activity 2-like (SKIV2L) RNA helicase (a homolog of the *S. cerevisiae* Ski2 protein) on the basis of its direct and preferential interaction with HBV X-mRNA. This interaction was essential for HBV X-mRNA degradation at the RNA exosome. The degradation of HBV X-mRNA at the RNA exosome was also mediated by HBS1L protein, a known component of the host RNA quality control system. We found that the redundant HBV-precure translation initiation site present at the 3' end of HBV X-mRNA (3' precure) is translationally active. The initiation of translation from this site without a proper stop codon was identified by the Non-Stop mediated RNA decay mechanism (NSD) leading to its degradation. Although 3'

precure is present in the 5 main HBV-RNA transcripts; only X-mRNA lacks the presence of an upstream start codons for Large, Middle, and Small (L, M, and S) HBV surface proteins. These upstream codons are in-frame with 3' precure translation initiation site, blocking its translation from the other HBV-mRNA transcripts. To our knowledge, this is the first demonstration of the anti-viral function of NSD.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

#### (10) Host factors required for HBV-cccDNA formation.

The final aim of this study is to identify host factors required for HBV cccDNA formation that can be targeted by drugs for HBV treatment. Human helicases play an important role in DNA repair pathways, and may be involved in HBV-cccDNA formation. We first screened for helicases affecting HBV replication using shRNA library targeting 133 human helicase genes. We further identified those who are required for HBV replication. Based on the reported effect, helicases were then grouped into functional groups, one of which is the Recq helicase group containing (RecqL, and WRN) helicases which plays an important function in DNA repair including mismatch repair, nucleotide excision repair and direct repair. Chromatin immunoprecipitation identified the direct interaction between RecqL helicase and HBV-cccDNA. Further mechanistic analysis is undergoing to analyze the mechanism by which RecqL can regulate HBV replication.

[Hussein H Aly, Takanobu Kato, Takaji Wakita]

#### (11) HBV 侵入を阻害するシクロスポリンおよびその誘導体の抗 HBV 作用機序の解析

シクロスポリンは細胞毒性を示すことなく HBV 感染受容体 NTCP とエンベロープタンパク質 LHBs の結合を阻害し、HBV 感染を阻害する。シクロスポリン誘導体を用いた解析により、HBV 感染にはシクロスポリンの免疫抑制作用及びシクロフィリン阻害作用は必要でな

いことが示唆された。

[志村聡美, 渡士幸一, Michael Peel (SCYNEXIS), 河合文啓 (横浜市立大), 朴三用 (横浜市立大), 脇隆字]

#### (12) 微小管による HBV 複製制御機構の解析

HBV 複製細胞株 Hep38. 7-Tet 細胞を用いた解析より、ノコダゾールが HBV 複製を阻害することが示された。また微小管合成を阻害する別の化合物も同等の効果を有していたことより、微小管は効率良い HBV 複製に必要であることが示唆された。

[岩本将士, 渡士幸一, 脇田隆字]

#### (13) HBV 感染感受性を低下させる Ro41-5253 の作用機序の解析

Ro41-5253 を前処理した細胞では NTCP タンパク質発現低下により HBV 感染感受性が低下することを見出した。Ro41-5253 はレチノイン酸受容体の転写活性を低下させることにより NTCP 遺伝子転写を減少させることが示唆された。またレチノイン酸受容体が、ヒト NTCP 遺伝子プロモーターの-112 から-96 領域を介して NTCP 遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。

[九十田千子, 渡士幸一, 岩本将士, 脇田隆字]

#### (14) 新規天然物 vanitaracin A の HBV 侵入阻害効果の解析

HepG2-hNTCP-C4 細胞を用いたスクリーニングより、新規真菌二次代謝産物が HBV 感染を強く阻害することを明らかにし、この化合物を vanitaracin A と命名した。vanitaracin A は HBV 受容体 NTCP と直接相互作用し HBV 侵入を阻害することを明らかにした。またこの化合物は NTCP 依存的胆汁酸取り込みも同様に阻害することを示した。

[金子学, 渡士幸一, 紙透伸治 (東京理科大), 菅原二三男 (東京理科大), 河合文啓 (横浜市立大), 朴三用 (横浜市立大), 脇田隆字]



(15) FDA 承認化合物を用いた HBV 感染阻害化合物の同定

HepaRG 細胞を用いて FDA 承認化合物ライブラリーより HBV 感染を阻害する化合物を同定した。この化合物は既存の治療薬としての薬理作用とは異なる作用機序により感染阻害を引き起こすことが示唆された。

[深野顕人, 渡士幸一, 河合文啓 (横浜市立大), 朴三用 (横浜市立大), 脇田隆字]

(16) NCTP 以外の entry に関する宿主因子の同定

HBV の entry に関する因子として HBV preS1 と結合する NTCP が発見された。一方、HBV S 領域を標的とする酵母で作製した B 型肝炎ウイルスワクチンは抗体獲得率 95% (40 歳) で、HBV 感染防御効果も大変高いことが知られている。また、preS1 領域が欠損した HBV の存在が多く報告されており、このようなウイルス感染者からも肝癌発症が報告されている。実際、NCTP 発現 HepG2 細胞を樹立し、HBV を感染させたところ、感染効率は約 50% で、感染しない細胞群が存在した。そこで、我々は NCTP 以外の entry 因子を同定するため、HBV mRNA を標的とする蛍光プローベを細胞に導入することで、生きたまま HBV 感染 HepG2-NTCP 細胞と非感染細胞の分別を行い、それぞれの細胞の性状解析を行っている。

[藤本陽, 青柳東代, 相崎英樹, 脇田隆字]

(17) 創薬スクリーニングのための HBV mRNA 測定法の開発

HBV mRNA を標的とする蛍光プローベを細胞に導入することで、細胞を生かしたまま HBV mRNA 量測定系を開発している。蛍光プローベは培養上清に添加するだけで各種肝細胞に効率良く取り込まれ、細胞毒性も認められなかった。現在、細胞内 mRNA 量と比較検討している。

[藤本陽, 青柳東代, 相崎英樹, 脇田隆字]

(18) 抗ウイルス薬の標的候補分子の同定

テトラサイクリン誘導 HBV 発現細胞の HepAD38 細胞

(genotype D) からサブクローニングされた Hep38.7-Tet 細胞を用いて、細胞外 HBeAg 量を指標に 3 種類の siRNA Library (DNA damage response、Epigenetic、Nucleic Acid Binding) のスクリーニングを実施した。HBeAg 分泌阻害を示した 80 遺伝子を primary hits として選抜した。さらに再現性評価として、HBeAg 分泌阻害及び cccDNA 合成阻害を示した 21 遺伝子を second hits として選抜した。次に Hirt DNA を精製し cccDNA 量の減少と knockdown 効率の相関を検討した。1 遺伝子が cccDNA 産生に関与している可能性が考えられた。

[木下渉 (JT 医総研), 渡士幸一, 脇田隆字]

(19) 参照 B 型肝炎ワクチンのロット更新

参照 B 型肝炎ワクチン Lot. P3 の在庫が少なくなったため、次期参照ワクチンの更新及び値付けを実施した。次期参照ワクチン候補として化学及血清療法研究所の組換え沈降 B 型肝炎ワクチン「ビームゲン Y086」を粗材買い上げした。各メーカー了承の元、当室で力価試験 (in vivo) を 3 回繰り返して値を決定した。参照ワクチン候補品の相対力価は 5.8 参照単位/mL とし、次期参照 B 型肝炎ワクチン Lot. P4 として業務委員会、検定協議会に報告、承認された (平成 27 年 7 月 2 日)。

[清原知子, 佐藤知子, 李天成, 塩田智之, 吉崎佐矢香, 石井孝司, 落合雅樹 (品質保証・管理部), 脇田隆字]

(20) ロットリリースに関する WHO ガイドラインの和訳

海外のワクチン等に対するロットリリース制度の調査に関連して行われた「規制当局によるワクチンのロットリリースに関するガイドライン “Guidelines for Independent Lot Release of Vaccines by Regulatory Authorities, TRS978, Annex2, 2013”」の和訳作業に参加した。

[清原知子, 内藤誠之郎 (品質保証・管理部)]

(21) cccDNA 複製に係わる宿主因子の同定と解析

HBV の持続感染には cccDNA の複製機構が重要な役割を果たしている。抗ウイルス療法に対して cccDNA が抵抗性なため、ウイルス排除が困難である。そこで、HBV 複製細胞内で cccDNA 合成あるいは安定化に関与する宿主因子を探索し、RNA スプライシングに関与する因子を同定した。現在その機能解析を進めている。  
[木下渉、小倉直樹（日本たばこ産業（株）医薬総合研究所）、アリ・フセイン、脇田隆字]

3. C 型肝炎ウイルス (HCV) に関する研究

(1) ビタミン D により誘導される抗菌ペプチド LL-37 の抗 HCV 作用の解析

ビタミン D により誘導される抗菌ペプチド、LL-37 による抗 HCV 作用の検討を行った。LL-37 を培養細胞に投与し培養細胞で作製した JFH-1 ウイルスを感染させると、その感染増殖が著明に抑制されることわかった。作用機序の検討の結果、LL-37 は HCV の感染性粒子を破壊する事でその感染を阻害していた。また、この感染増殖の抑制は JFH-1 株のみでなく遺伝子型 1 株を含む他の株においても認める事が明らかとなった。

[松村卓哉(昭和大), 井廻道夫(新百合ヶ丘総合病院), 椎名正明(新百合ヶ丘総合病院), 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(2) ビタミン D アナログの抗 HCV 活性の解析

ビタミン D 前駆体の一つである 25 ヒドロキシビタミン D3 には抗 HCV 作用があることが知られている。その作用機序を解明するために、25 ヒドロキシビタミン D3 の様々なアナログの抗 HCV 作用を比較検討した。その結果、アナログの中には強い抗 HCV 活性を持つもの、抗 HCV 活性の低いもの、抗 HCV 活性のないものが含まれていた。さらに、その抗 HCV 活性の作用機序を解析すると、感染を阻害するものと、粒子形成を阻害するものが見られた。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(3) ペロ細胞における HCV 感染の検討

ペロ細胞では HCV の感染はみられないが、HCV の 4 種類のヒト HCV 受容体 (CD81, Occludin, Claudin-1, SR-BI) をレンチウイルスベクターで発現させると HCV 感染が観察できるようになった。さらに、4 種類のヒト HCV 受容体のうち、ヒト SR-BI を発現させると HCV 感染が可能となったが、CD81, Occludin, Claudin-1 の発現では HCV 感染はみられなかった。以上の結果から、ペロ細胞にヒト SR-BI を発現させると HCV 感染が可能となることが判明した。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(4) ペロ細胞の HCV 受容体分子の機能解析

ペロ細胞では HCV の感染はみられないことから、ペロ細胞で発現している HCV 受容体分子の発現量と配列を調べたところ、ペロ細胞では Huh-7.5.1 と比較して Claudin-1 と SR-BI の発現量が低かった。さらに、ペロ細胞のそれぞれの受容体分子の配列には Huh-7.5.1 と比較して、異なる箇所があった (CD81; 4 か所, Occludin; 15 か所, Claudin-1; 2 か所, SR-BI; 12 か所)。そこで、ペロ細胞で発現している HCV 受容体分子が HCV 受容体として機能できるかを、それぞれの受容体欠損細胞を用いて調べた。その結果、4 種類の HCV 受容体分子は、いずれも高発現させればヒト HCV 受容体と同様に機能することが判明した。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(5) ペロ細胞における HCV ライフサイクルの検討

複製に重要な宿主因子である miR-122, 感染に重要な因子である SR-BI, 感染性ウイルス粒子産生に重要な因子である ApoE をレンチウイルスベクターによりペロ細胞に発現させた。この細胞では、感染、ゲノム複製、ウイルス産生が見られ、ペロ細胞で HCV ライフサイクル全体が観察できるようになった。

[村山麻子, 杉山奈央, 脇田隆字, 加藤孝宣]

(6) IFN 治療著効判定 9 年後に HCV 陽性と診断された症例の HCV 塩基配列の検討

C 型慢性肝炎に対し Peg-IFN・リバビリン併用療法を行い、HCV RNA 定性検査を用いた評価で SVR と判定されたが約 9 年後に HCV RNA 陽性となった症例を認めた。治療開始前と 9 年後 HCV RNA 検出時の血清から HCV 株を分離し、ウイルスゲノムの塩基配列の相同性について検討を行った。得られた HCV 株は 98.9%の相同性を持ち、分子系統樹による解析でも近縁に位置したため、この症例は新規 HCV 株の再感染ではなく、HCV の再燃が疑われた。

[山田典栄, 小林稔(清川病院), 安田清美(清川病院), 奥瀬千晃(聖マリアンナ医大), 鈴木通博(聖マリアンナ医大), 四柳宏(東京大学), 脇田隆宇, 加藤孝宣]

#### (7) 臨床検体を用いた HCV RNA 検出系の評価

HCV RNA 定性検査を用いた評価で SVR と判定されたが約 9 年後に HCV RNA 陽性となった症例の保存血清を用いて、より高感度な HCV 検出系であるリアルタイム PCR 法 (アキュジーン m-HCV ; アボットジャパン) を用いて再測定を行った。その結果、IFN 治療終了 24 週後は HCV RNA 定性検査では陰性と判定されたが、リアルタイム PCR 法では陽性と判定され、HCV の残存が確認された。C 型慢性肝炎治療後の経過観察には高感度検出系による HCV RNA の定期的な検査が重要であることが示唆された。

[山田典栄, 小林稔(清川病院), 安田清美(清川病院), 奥瀬千晃(聖マリアンナ医大), 鈴木通博(聖マリアンナ医大), 四柳宏(東京大学), 脇田隆宇, 加藤孝宣]

#### (8) NS5A 阻害剤耐性変異株の特徴に関する検討

DAA 剤の登場により IFN-free 治療を含む様々な治療法が確立され、C 型慢性肝炎に対する標準治療が変化してきた。その中で NS5A 阻害剤は強い抗 HCV 作用を持つ一方、耐性変異によってその効果が減弱するため、耐性変異株を有する患者に対する治療戦略の確立が課題となっている。そこで、HCV JFH-1 キメラウイルスの感染培養系を用いて、NS5A 阻害剤に対する耐性変異が HCV のライフサイクルに与える影響を検討した。その結果、NS5A 阻害剤耐性にかかわる Y93H 変異を含

む株では培養上清中、培養細胞内の感染力価が高く、感染性粒子の生成効率が亢進していることが明らかとなった。

[新田沙由梨, 杉山奈央, 脇田隆宇, 加藤孝宣]

#### (9) NS5A 阻害剤耐性変異株の抗 HCV 薬感受性に関する検討

NS5A 阻害剤に対する耐性変異株に有効な薬剤の同定を目的として検討を行った。耐性変異を導入したキメラウイルスを導入した培養細胞を各種抗 HCV 剤で処理を行い、細胞内 Core 抗原量を測定することで耐性変異株に有効な薬剤の同定を試みた。その結果、IFN-製剤や Ribavirin ではその阻害活性に差を認めなかったが、第二世代プロテアーゼ阻害剤である Simeprevir と Asunaprevir では Y93H 変異を持つウイルスに対してより強い阻害活性を示した。従って NS5A 阻害剤に対する耐性変異を含むウイルスは第二世代プロテアーゼ阻害剤に感受性であると考えられ、変異株を有する患者に対してはこれらの薬剤を含む治療が選択肢の一つとなり得ると考えられた。

[新田沙由梨, 杉山奈央, 脇田隆宇, 加藤孝宣]

#### (10) HCV コア領域のアミノ酸変異が IFN 感受性に与える影響の評価

構造領域が HCV Genotype 1b 由来、非構造領域が 2a 由来のキメラウイルスを作成し、HCV コア領域のアミノ酸変異が IFN 感受性に与える影響の評価を行った。このキメラウイルスに IFN の感受性に関わることが報告されている aa 70 (R/Q) と aa 91 (L/M) の変異を導入し (TH/JFH1-RL, -RM, -QL, -QM), IFN 感受性に与える影響を検討した。これらの HCV 株の全長 RNA をそれぞれ Huh7.5.1 細胞に導入した後、IFN- $\alpha$  を添加し HCV core 抗原量の変化を測定したところ、いずれの変異株でも HCV core 抗原量が低下し、変異による IFN 感受性に差は見られなかった。しかし IFN により宿主細胞表面に発現誘導される MHC Class I を Flow Cytometry を用いて測定したところ、QL 株、QM 株で細胞表面の MHC class I の発現量が低く抑えられ、Core

領域 70 番アミノ酸に変異を有するウイルスは、宿主細胞内に蓄積し抗原提示能を抑制することで宿主リンパ球による細胞障害を逃れ、IFN 治療に対して抵抗性を獲得するものと考えられた。

[藤田めぐみ, 杉山奈央, Eui-Cheol Shin (韓国 KAIST), Wonseok Kang (韓国 KAIST), 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (11) HCV NS5A-ISDR アミノ酸変異が HCV 増殖に与える影響の解析

HCV の NS5A に存在する IFN 感受性領域 (ISDR) のアミノ酸変異は、IFN 治療における治療効果の予測因子として知られている。そこで、JFH-1 株を用いた培養細胞系を用い、ISDR のアミノ酸変異が HCV の増殖に与える影響を検討した。HCV JFH-1 株の NS5A を Genotype 1b 株に置換したキメラウイルス (JFH1/5ACon1) を用い、さらに、NS5A の ISDR を wt に置換した i-wt 株および、ISDR に 7 つのアミノ酸変異を持つ i-7mut 株を作製した。これらのコンストラクトを用い、ISDR の変異が HCV ライフサイクルの各ステップに与える影響を評価した。これらの株の HCV 全長 RNA の導入により細胞内の core 抗原量には差は認めなかったが、上清中の core 抗原量は i-7mut でのみ低値であり、この株では感染性粒子生成効率が低下していると考えられた。

[杉山隆一, 杉山奈央, 村山麻子, 藤田めぐみ, 山田典栄, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (12) HCV 感染による宿主 microRNA 機能の抑制

HCV 複製は miR-122 機能に大きく依存しているため、HCV 感染細胞内では宿主標的遺伝子に対する miR-122 機能が障害されている可能性がある。miR-122 により負に制御される複数の宿主細胞性因子の遺伝子発現が HCV 感染後に増加することをマイクロアレイ、RT-qPCR、ルシフェラーゼレポータープラスミドを用いた解析で明らかにした。それらの中には肝発癌に関わる遺伝子も含まれており、HCV による肝発癌機序の新たな知見として期待される。

[政木隆博, 脇田隆字, 加藤孝宣]

#### (13) HCV 感染における宿主 microRNA 発現の解析

HCV 感染、非感染細胞における宿主 microRNA 発現をマイクロアレイで比較解析した。解析した 2,006 種類の microRNA のうち 193 種類が感染 Huh7.5.1 細胞で発現していた。そのうち、158 種類の発現が感染に伴い上昇 (うち 15 種類が 2 倍以上の上昇)、34 種類の発現が低下 (うち 3 種類が 2 倍以上の低下) していた。現在、HCV 感染に伴い発現変化のみられた microRNA に着目し、それらの microRNA が HCV の生活環に及ぼす影響を解析している。

[政木隆博, 加藤孝宣, 脇田隆字]

#### (14) フルタミドを用いた感染性 HCV 粒子産生機構の解析

フルタミドが感染性 HCV 粒子形成過程を阻害することが示唆された。またこの化合物は肝細胞内の脂肪滴量を減少させること、その作用には芳香族炭化水素受容体阻害効果が重要であることが示唆された。一方芳香族炭化水素受容体アゴニスト処理により感染性 HCV 粒子産生が上昇することが認められた。

[大橋啓史, 渡士幸一, 脇田隆字]

#### (15) ネオエキヌリン B の HCV 複製抑制作用及び生理活性の解析

真菌抽出物よりネオエキヌリン B が HCV 複製を低下させることを見出した。またトランスクリプトーム解析よりこれは肝臓 X 受容体の転写活性を阻害し、その下流遺伝子誘導をブロックすることが明らかとなった。本研究より肝臓 X 受容体転写活性と HCV 複製レベルに相関があることが明らかとなった。

[中嶋翔, 渡士幸一, 紙透伸治 (東京理科大), 菅原二三男 (東京理科大), 鈴木治和 (理化学研究所), 脇田隆字]

#### (16) C 型肝炎ウイルス中和エピトープを有する日本脳炎ウイルス様粒子の作製

日本脳炎ウイルス (JEV) E タンパク質の粒子表面に露出すると予想される部位に HCV E2 由来中和エピトープ

プを挿入し、JEV 様粒子(SVP)の分泌が阻害されない部位を3ヶ所同定した。3ヶ所に同時にエピトープを挿入しても粒子が分泌された。挿入されたエピトープが粒子表面上に提示されている事を、蛍光相関分光法を用いて確認した。さらに HCV 中和エピトープを有する JEV SVP (SVP-E2) を恒常的に発現する 293T 細胞を樹立し、培養上清から粒子を精製した。

[嵯峨涼平, 松田麻未, 長谷川慎(長浜バイオ大), 加藤孝宣, 中村紀子(東レ医薬研), 小西英二(阪大微研), 竹山春子(早大院), 鈴木亮介, 脇田隆字]

#### (17) C型肝炎ウイルス中和エピトープを有する日本脳炎ウイルス様粒子による中和抗体の誘導

培養上清から精製した HCV 中和エピトープを有する日本脳炎ウイルス様粒子 (SVP-E2) をマウスの腹腔に免疫した。SVP-E2 免疫マウスの血清は JEV および遺伝子型 1b、2a および 3a 由来 HCV に対する感染中和能を示した事から、外来エピトープ挿入 JEV SVP は JEV および他の病原体に対して効率良く中和抗体を誘導する二価ワクチン抗原としての可能性が示唆された。

[嵯峨涼平, 藤本陽, 渡邊則幸, 松田麻未, 長谷川慎(長浜バイオ大), 加藤孝宣, 中村紀子(東レ医薬研), 小西英二(阪大微研), 田島茂(ウイルス第一部), 高崎智彦(ウイルス第一部), 竹山春子(早大院), 鈴木亮介, 脇田隆字]

#### (18) 細胞内発現抗体による C 型肝炎ウイルスコア蛋白質発現による NF- $\kappa$ B シグナル活性化の抑制

C型肝炎ウイルス(HCV)のコア蛋白質に対する抗体の H 鎖および L 鎖の可変部遺伝子をクローニングし、発現プラスミドを作製した。細胞内で発現させた単鎖可変部(イントラボディ)は、コア蛋白質との結合が認められ、また一部のイントラボディは HCV の増殖を顕著に抑制した。またこれらのイントラボディは、コア蛋白質の発現によって活性化される NF- $\kappa$ B シグナルに対しても抑制効果を示した。

[鈴木亮介, 斎藤憲司, 松田麻未, 佐藤充(農業生物資源研), 鐘ヶ江裕美(東大医科研), 千葉丈(東京理科

大), 斎藤泉(東大医科研), 脇田隆字, 鈴木哲朗(浜松医大)]

#### (19) HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化

HCV 感染に伴う細胞内代謝の変化を理解するため、代謝物質の網羅的解析(メタボロミクス)を行った。HCV 感染により、TCA 回路、プリン・ピリミジン合成系など蛋白核酸合成等は低下し、ATP、GTP、phosphocreatine 等のエネルギー供与体は減少し、一方解糖系は著明に亢進していた。HCV 感染がどのようなメカニズムで宿主代謝に影響を与えているか解析を進めている。

[藤本陽, 松田麻未, 相崎英樹, 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

#### (20) HCV 感染が宿主細胞のリボ蛋白の代謝に与える影響

HCV 感染による肝脂肪化の原因のひとつとして、超低比重リボ蛋白(VLDL)分泌低下が報告されている。一方、VLDL は HCV の感染性に必須と報告されており、これらの矛盾点を解明するため生体での脂質輸送の中心を担っているリボ蛋白を解析した。HCV 感染後、培養上清中の VLDL が増加し、低比重リボ蛋白(LDL)が低下することを見出し、その原因として HCV 感染細胞での VLDL 分解酵素である Hepatic lipase (HL) の発現低下を見出した。HL を過剰発現させた Huh-7 細胞に HCV を感染させた後、培養上清中 HCV の感染価を測定したところ、著しい感染価の低下が見られた。また、HCV 感染直後には一時的に HL 発現発現が見られるものの、感染後時間経過的に HL 発現が低下した。このことから、抗ウイルス応答としての HL 発現上昇が HCV により抑制され、感染性の維持に都合の良い環境を作り出している可能性が示唆された。

[藤本陽, 相崎英樹, 脇田隆字]

#### (21) HCV に対する抗ウイルス治療後、SVR 後の病態に関する研究

C 型慢性肝炎に対する治療は IFN/DAA の治療で 9 割以上の患者に SVR が期待できる。しかしながら、発癌

リスクの高い線維化進展例や高齢者の多くがSVRとなる一方、IFNと異なりDAAの肝発癌抑制作用については不明であり、今後SVR後の肝障害や発癌が増加することが懸念される。そこで、今後増加するSVR後症例の肝障害・肝発癌のリスク評価と抑制法の開発のため、SVR後の肝病態の解明と新たな検査系・対処法の確立を目指す。

[青柳東代、相崎英樹、小池和彦(東京大学)、平松直樹(大阪大学)、黒崎雅之(武蔵野赤十字病院)、林和彦(名古屋大学)、飯島尋子(兵庫医科大学)、坪田昭人(東京慈恵会医科大学)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、考藤達哉(国立国際医療研究センター)、丸澤宏之(京都大学)、福原崇介(大阪大学)、和氣健二郎(ミノファーマ製薬)、市野瀬志津子(東京医科歯科大学)、脇田隆字]

#### (22) HCV感染に伴う細胞微細構造変化の解析

HCV感染に伴う肝組織の微細構造変化については多くの報告があるものの統一的な判断基準はない。SVR症例の肝組織の電顕観察を進め、SVR後F値が改善しない症例で優位に発がんを認めた。また、SVR後も長期間にわたりオルガネラ異常が観察され、「post-SVR syndrome」というような病態を見出した。SVR後も継続する指標としてミトコンドリア障害、核膜異常、軽減する指標としてDMVを見出した。

[青柳東代、松田麻未、市野瀬志津子(東京医科歯科大)、和氣健二郎(ミノファーマ製薬)、相崎英樹、脇田隆字]

#### (23) HCV生活環に関与するHCV-NS4B結合膜蛋白の同定と解析

NS4B発現細胞からpull-down法によりNS4Bに結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screeningを行ったところ、複製過程に関与するタンパクとしてPREBおよびSURF4を見出した。PREB、SURF4は複製複合体を含むHCV特有の膜構造物形成に重要な役割を果たしてもものと考えられた。

[Lingbao Kong(江西農業大学)、山越智(生物活性

物質部)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、相崎英樹、脇田隆字]

#### (24) スフィンゴ脂質のHCV複製複合体を含む小胞形成における役割の解析

スフィンゴ脂質合成阻害剤により、HCV複製が抑制されることを見出した。スフィンゴ脂質がDMV形成に関与している可能性が示された。

[イード ホッサム、深澤征義(細胞化学部)、花田賢太郎(細胞化学部)、相崎英樹、脇田隆字]

#### (25) HCV生活環に関与するHCV-NS5A結合膜蛋白の同定と解析

NS5A発現細胞からpull-down法によりNS5Aに結合する膜蛋白を精製し、プロテオーム解析、siRNA screeningを行ったところ、翻訳、複製過程に関与するタンパクとしてELAVL1を見出した。HCV RNAと結合するELAVL1はNSタンパク質と結合の有無により、HCV翻訳・複製を調整しているものと考えられる。

[後藤耕司(東大感染症内科)、山越智(生物活性物質部)、小池和彦(東大消化器内科)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、相崎英樹、脇田隆字]

#### (26) HCV感染に伴う核膜孔変化の解析

電顕観察により、HCV感染に伴い核膜孔の増加が観察された。そのメカニズムとウイルス産生に与える影響を調べるため、NS4B、NS5A発現細胞からpull-down法によりNS4B、NS5Aに結合する核膜蛋白を同定した。共通する蛋白に着目し、解析を進める。

[青柳東代、相崎英樹、山越智(生物活性物質部)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、脇田隆字]

#### (27) HCV粒子形成に関与する脂肪滴周辺膜蛋白の同定と機能解析

脂肪滴周辺膜のプロテオーム解析、siRNAによるスクリーニングで、HCV粒子形成に関与する生体膜蛋白としてHSDを見出した。HSDはNS5Aと結合し、HCV粒子形成の場である脂肪滴へ導くことが示された。さら

に、HSD は脂肪滴の産生にも影響を与えることが判明した。

[相崎英樹, 深澤征義(細胞化学部), 花田賢太郎(細胞化学部), 本島清人(明治薬科大学), 鈴木哲朗(浜松医科大学), 脇田隆字]

#### (28) 肝星細胞の HCV 感染性の解析

肝星細胞の活性化が肝線維化と密接に関連していることから、HCV が肝星細胞に感染増殖するかを明らかにすることは重要な課題である。HCV 感染細胞と星細胞共培養すると HCV が星細胞に移行した。HCV RNA が複製活性を維持したまま、細胞間をエクソゾームを介して移動することを見いだした。

[在津拓馬、青柳東代、相崎英樹、松浦知和(慈恵医大)、鈴木哲朗(浜松医科大学)、脇田隆字]

#### (29) PLA2IB の HCV 粒子放出のメカニズムの解析

慢性 C 型肝炎患者に用いられているグリチルリチンの抗 HCV 作用について検討した。その結果、HCV 生活環のうち、特に感染性粒子形成において強い阻害効果を示した。その阻害効果は PLA2 の抑制と autophagy 亢進によるものの可能性が示唆された。GL の Autophagy 誘導のメカニズム、PLA2IB の HCV 粒子放出のメカニズムについて調べている。

[青柳東代、松本喜弘(慈恵医大消化器内科)、相崎英樹、松浦知和(慈恵医大病院中央検査部)、和氣健二郎(ミノファーゲン製薬)、脇田隆字]

#### (30) 肝炎検査陽性者のフォローアップシステムの構築

肝炎ウイルス感染を知らずながら治療を続けていない人も 57-120 万人も存在すると推定されている。そこで、肝炎ウイルス検査により見いだされた陽性者を専門医療機関へ導き、フォローアップすることを目的にしている。17 の県・市(A 県、東京都 A 市、神奈川県 A 市、愛知県 A 市、静岡県・香川県・福井県の

市)をモデル地区として、1555 人の陽性者をフォローアップした。結核予防会、JCHO 等の大規模検診機関へ支援している。

[相崎英樹、飯島尋子(兵庫医大)、石上 雅敏(名古屋大学)、片野義明(名古屋大学)、菊池嘉(国立国際医療研究センター)、工藤正俊(近畿大学)、坂本穰(山梨大学)、島上哲朗(金沢大学)、正木尚彦(国立国際医療研究センター)、吉岡健太郎(藤田保健)、米田政志(愛知医大)、渡邊綱正(名古屋市立大学)、脇田隆字]

#### (31) 肝炎情報の収集とデータベース構築及び情報発信

肝炎ウイルス感染の予防、肝炎ウイルスキャリア対策、肝癌死亡の減少に貢献することを目的として、肝炎ウイルス感染、病態等を含む国内外の情報等の収集とデータベースの構築、および情報の提供を行って来た。感染研ウイルス第二部のホームページから、一般のヒト、家庭医、専門家向けに、それぞれ適切な内容の情報を発信している。感染症週報「HBV, HCV」を更新し、最新の治療について報告した。

[相崎英樹、田中純子(広島大)、脇田隆字]

#### (32) 本邦における急性 C 型肝炎のサーベイランス

感染症法に基づくサーベイランス事業で、1999 年から 2013 年間の 14 年間の急性 C 型肝炎の発生動向を調べ報告した。急性 C 型肝炎の発生は 2010 年ころから約 50 症例以下に抑制されていたものの、HIV 陽性同性愛者の性的感染が増加傾向を示し、遺伝子を調べたところ、同じウイルスが蔓延している可能性が示唆された。

[相崎英樹、砂川富正(感染症疫学センター)、田中純子(広島大)、脇田隆字]

#### (33) HIV 陽性者における急性 C 型肝炎の集団発生について

2012 年、HIV 陽性同性愛者から 5 人の急性 HCV 感染

例が見出された。解析の結果、感染源を共有している可能性及び、濃厚かつ繰り返す感染機会を有していた可能性が考えられたため、全国の保健所を通じて、HIV陽性者に対しHCV感染予防について啓発を行ったところ、一時的であるが急性肝炎の発生を抑制できた。2014年に再び発生したことから、継続的な啓発の必要性が示された。

[青柳東代、井戸田一朗(しらかば診療所)、相崎英樹、脇田隆字]

#### (34) 霊長類モデルを用いた培養細胞由来HCV粒子ワクチンの有効性の検討

霊長類モデルとしてマーモセットを用い、培養細胞由来HCV粒子の免疫原性の検討を行った。アジュバントとしてAlum群に加え、K3 CpGとSchizophyllan (SPG)の複合体であるK3-SPG群を設定し、HCV粒子ワクチンの有効性評価を行った。粒子免疫の結果、K3-SPGをアジュバントとして免疫したマーモセット血漿より精製したIgG抗体は、免疫抗原である遺伝子型2aのキメラHCVccだけでなく、遺伝子型1b、1a、3aのキメラHCVccに対しても濃度依存的な感染阻害活性を示した。またK3-SPG免疫群マーモセットより得た脾臓細胞は、遺伝子型2aのコアタンパク質による刺激によりIFN $\gamma$ の発現を促進することが示され、HCV粒子ワクチンにより細胞性免疫が誘導される可能性が示唆された。以上より、K3-SPGアジュバントを用いることにより培養上清由来HCV粒子は高い感染防御効果を持つワクチンとなり得る可能性が示唆された。

[横川寛、鈴木知比古(東レ医薬研)、東濃篤徳(京大霊長類研)、鈴木沙織(京大霊長類研)、明里宏文(京大霊長類研)、鈴木亮介、石井孝司、加藤孝宣、脇田隆字]

#### (35) ファージディスプレイ法により見出したヒト抗E2抗体のHCVに対する感染中和活性の検討

HCV感染患者より得た抗体遺伝子ライブラリーを用いて、ファージディスプレイ法にてHCV E2エンベロープタンパク質に親和性を示す抗体をスクリーニングした。

スクリーニングにて見出した3種の抗体に関して、HCVccに対する感染阻害活性を検討した結果、これら3種のIgG抗体および単鎖抗体(scFv)は遺伝子型1a、1b、2a、3aのJFH-1キメラHCVccに対して既知E2抗体より強い感染阻害活性を示した。またエスケープ変異株が発生しづらい抗体であり、エスケープ変異株の発生に耐性を持つ事が報告されている既知E2抗体と比べて同等かそれ以上の変異株発生耐性を示した。

[横川寛、岩村智勝(東レ医薬研)、鈴木知比古(東レ医薬研)、篠原みどり(抗体研究所)、石井孝司、加藤孝宣、脇田隆字]

#### (36) 遺伝子型 2b ウイルスのコアと脂肪滴の局在の検討

遺伝子型 2b 感染細胞内の HCV コアと脂肪滴の局在を免疫染色し、免疫蛍光法で検出し、蛍光顕微鏡で観察した。その結果、JFH1 のコア蛋白質の大部分が脂肪滴周囲に局在しており、一方 J6/JFH1 と 2b では JFH1 とは異なる局在が見られた。

[Su Su Hmwe, Goki Suda (Hokkaido University), Naoya Sakamoto (Hokkaido University), Michio Imamura (Hiroshima University), Nobuhiko Hiraga (Hiroshima University), Kazuhiko Chayama (Hiroshima University), Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

#### (37) 遺伝子型 3a の患者血清から分離した HCV 株の解析

フランスの遺伝子型 3a の C 型肝炎患者 16 人の血清から HCV RNA を抽出し、cDNA を合成し、HCV コア領域を含むように PCR を行い、シーケンスした。その HCV 株の遺伝子型 3a(S52)のコンセンサス配列と比較した。その塩基配列を解析した結果、脂肪肝とコアのアミノ酸の配列の関係が確認出来なかった。

[Su Su Hmwe, Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

#### (38) 複製効率の良い遺伝子型 1b(NC1 株)のサブジェノミックレプリコン構築の検討

細胞培養で複製効率の良い遺伝子型 1b のウイルス株



は未だに存在しない。Wild type 遺伝子型 1b の RNA をエレクトロポレーション法により肝癌由来の Huh7.5.1 細胞に導入しコロニー形成アッセイを行った。得られた 12 クローンの塩基配列をシーケンスした結果、NS4B と NS5A 領域に変異を同定した。得られた NS4B と NS5A の変異を wild type のネオマイシン耐性遺伝子を持つサブジェノミックレプリコンに導入し、8 つのコンストラクトを作製した、複製が上昇するかを検討して。

[Su Su Hmwe, Hideki Aizaki, Takaji Wakita]

#### (39)HCV E1 (282-311) 領域に対する抗体の樹立

アミノ酸配列から抗原性の高いと予想される12アミノ酸 (293-304) と30アミノ酸 (282-311) のペプチドをウサギに免疫してポリクローナル抗体を作製した。作製した抗体の反応性について組換えタンパク質を用いて解析したところ、12アミノ酸の抗体は主に E1 (282-311) の真ん中、30アミノ酸の抗体はC端側の配列を認識した。ウサギ血清から精製したIgGを用いてウイルス感染の阻害実験を行ったところ、12アミノ酸の抗体については感染阻害効果が観察された。12アミノ酸の領域は抗体による感染阻害のターゲットとなり得ると考えられる。

[渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字]

#### (40)Gaussia Luciferase (GLuc) を組み込んだ HCV 感染系の樹立

HCV 培養系で最も増えるキメラ HCV である Jc1 (J6 株の構造領域+JFH-1 株の非構造領域) に分泌型ルシフェラーゼの GLuc を組み込んだ Jc1-GLuc を作製して、その性状を解析した。Jc1-GLuc については、Jc1 の非構造領域の p7 と NS2 の切断部位に GLuc と自己切断配列を付加した遺伝子配列を組み込んで作製した。鋳型となる Jc1-GLuc プラスミドから RNA を合成し、細胞にトランスフェクションしてウイルスの増殖について解析した。培養上清中の HCV コア量、ルシフェラーゼ活性を継時的に測定して、ウイルスの増加を確認した。更に、力価は低いウイルスの感染性についても確認

できた。

[渡邊則幸、脇田隆字]

#### (41)適応変異を獲得した Jc1-GLuc の樹立

Jc1-GLuc ウイルスが自己の増殖を上昇させるような適応変異を獲得するかを調べるために長期培養を行った。細胞に合成 RNA をトランスフェクション後、継代培養して継時的に培養上清中のコアタンパク質量を測定した。トランスフェクション後 5 日から 15 日にかけて培養上清中のコアタンパク質が 100 倍以上に上昇した。更に、ルシフェラーゼ活性、ウイルスの感染力価についてもコアと同様に上昇した。遺伝子の全長配列を調べたが Jc1 配列にアミノ酸変異はなく、GLuc 配列中に 9 アミノ酸の欠損が観察された。9 アミノ酸を欠失する Jc1-GLuc を作製してこの欠失がコア量の上昇に関係するのかを調べる予定である。

[渡邊則幸、脇田隆字]

#### (42) 遺伝子型 4a の C 型肝炎ウイルス感染系の構築

主にエジプトに感染者が存在する遺伝子型 4aHCV のウイルス感染系の構築を試みた。ED41 レプリコンの適合変異を有する全長配列を有するプラスミドを構築して全長 RNA を合成し、Huh7.5.1 細胞にトランスフェクションした。一部の構築では培養上清中に感染性ウイルスの産生を認めた。さらに naïve 細胞への感染を繰り返して、感染性の増強を観察した。現在ウイルスゲノム上の適合変異について解析している

[相原那々子、渡邊則幸、伊達朋子、相崎英樹、脇田隆字]

#### 4. E 型肝炎ウイルス (HEV) に関する研究

##### (1)昨年度提示した HEV 受容体候補のウイルスへの結合および阻害解析

Fc 融合受容体候補タンパク質を作製し、免疫沈降法によって受容体候補とウイルス間の直接結合が確認された。また、抗受容体候補タンパク質ポリクローナル抗体によって両者の結合が阻害されたことから、今後、当該抗体を用いた感染阻害能を評価したい。

[塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之,\*  
下島昌幸, \*西條政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイルス  
第一部) ]

(2) ゲノム編集を用いた感受性細胞の HEV 受容体候補  
knock out による loss of function の検証

CRISPR/Cas9 ゲノム編集による HEV 受容体候補欠  
損 4-21 細胞(4-21KO)の作製をタカラバイオに委託し、  
納品された。まず、複数得られた 4-21KO 株の表現型  
解析を行い、完全に受容体候補タンパク質の発現が  
KO された株に対して、感染感受性を評価した所、4-21  
親株に比べて大きく感染感受性が低下していることが  
確認された。

[塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之,\*  
下島昌幸, \*西條政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイル  
ス第一部) ]

(3) 非感受性細胞での HEV 受容体候補発現による gain  
of function の検証

昨年度、非感受性細胞に HEV 受容体候補搭載ベク  
ターを導入、薬剤選択によって安定発現株を樹立し、  
抗原の分泌を確認した。また、(2)で得た 4-21KO 株に  
対して同様の操作によって HEV 受容体候補タンパク  
質をノックインした株を作出した。今後、本株の感受  
性を評価したい。

[塩田智之, 李天成, 吉崎佐矢香, 西村順裕, 清水博之,\*  
下島昌幸, \*西條政幸, 脇田隆宇, 石井孝司 (\*ウイル  
ス第一部) ]

(4) HEV レプリコンを用いたウイルス増殖阻害物質の  
スクリーニング

HEV レプリコン RNA を導入した細胞に薬剤ライブラ  
リーを添加し、レプリコンのレポーター遺伝子の発現  
を指標として阻害剤のスクリーニングを行った。現在  
までに市販化合物ライブラリ、東大薬学部創薬イノー  
ベーションセンターおよび医薬基盤研究所薬用植物資源  
研究センターの化合物ライブラリーから、本レプリコ  
ンの増殖を抑制するスクリーニングを行い、ウイルス

増殖阻害活性を持つ化合物の一部に共通の作用機序が  
存在することを見出した。また、植物エキスライブラ  
リーの一部にも強い増殖抑制活性を持つものが存在す  
るため、これらのエキスの分画を行い活性成分の単離  
を行っている。[吉崎佐矢香, 脇田隆宇, 石井孝司]

(5) HEV プロテアーゼのコムギ胚芽無細胞系での発現  
と活性検出

HEV のプロテアーゼと推定される領域は、活性中心  
に変異を導入するとレプリコンの複製が見られなくな  
ることからウイルス増殖に必須と考えられるが、プロ  
セシング機構等については不明のままであり、また毒  
性が強く大腸菌や哺乳類細胞での発現が極めて困難で  
ある。そのため、非構造蛋白をコードする ORF1 全長  
とプロテアーゼと推定される領域の 2 種について、コ  
ムギ胚芽無細胞系での発現を行い活性を検討した。そ  
の結果、ORF1 全長蛋白から弱いプロテアーゼ活性を確  
認することができた。今後、プロテアーゼ活性発現領  
域の同定と、ウイルス複製に果たす役割について検討  
する。[高橋宏隆、澤崎達也 (愛媛大学プロテオサイ  
エンス研究センター)、吉崎佐矢香, 脇田隆宇, 石井  
孝司]

(6) リバースジェネティク法を用いて DcHEV 感染  
クローンの作製

本研究では、体外で合成したラクダ由来の DcHEV  
の全長 RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトラ  
ンスフェクションし、経時的に培養上清を採取し  
た。ウイルス抗原と RNA を ELISA および RT-PCR  
により測定し、ウイルス増殖を確認した。さらに  
培養上清から取れた DcHEV カニクイザルに接種  
し、その感染性を評価した。その結果、DcHEV が  
カニクイザルにも感染することが明らかになった。

[李 天成, 周顕鳳, 吉崎 佐矢香, \*網 康至, \*須  
崎百合子, 脇田隆宇 (\*動物管理室)]

(7) DcHEV に対するラット, フェレットおよびウサギ  
の感受性

DcHEV ラクダとサル以外の動物に感染するかどうかはまだ明らかにされていない。本実験では DcHEV に対するラット、フェレットおよびウサギの感受性を感染実験で確認した。DcHEV を Nude rat, フェレットおよびウサギに接種し、経時的に採血と採便を行った。血中と便中の DcHEV 抗原、DcHEV RNA、さらに血中の anti-DcHEV-IgG、ALT/AST を測定しウイルスの感染の有無を評価した。その結果は DcHEV がラット、フェレットおよびウサギに感染しなかった。

[李 天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆字 (\*動物管理室)]

#### (8) Rat HEV ORF4 の機能の解析

Rat HEV の遺伝子構造は他の HEV と類似するが、Ferret HEV と同じ ORF4 というユニークなモチーフを持っている。ORF4 の機能はまだ明らかにされていない。本実験では Rat HEV (ドイツ株) rat HEV を用いて ORF4 のスタートコドン無くした全長 cDNA を作製したうえ、in vitro で RNA を合成した。ORF4 を持たない rat HEV RNA をヒト肝癌細胞 PLC/PRF/5 にトランスフェクションし、また、ヌードラット (Long Evans-rnu/rnu) 肝臓に直接に接種して、ウイルス増殖の変化を観察した。現在、ORF4 を持たない rat HEV の増殖能が低下することがわかった。現在組換えバキュロウイルスやパクリア発現システムを用いて ORF4 を発現している。

[李 天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆字 (\*動物管理室)]

#### (9) Nude rat と Rat HEV をモデルにした抗ウイルス製剤の評価

Rat HEV をヌードラット (Long-Evans rnu/rnu) に感染させると、rat HEV の持続感染を呈する。この持続感染モデルを用いて薬剤の抗ウイルス効果を観察するには非常に便利だと思う。本実験ではリバビリンを rat HEV に感染されたヌードラットに経口投与し、抗ウイルス効果を観察してみた。観察の結果により、リバビ

リンを経口投与による抗ウイルス作用が確認された。抗ウイルス作用が投与量に相関している。また、リバビリンによる副作用が確認された。現在リバビリン投与によるウイルス変異の有無を確認している。

[李 天成、吉崎 佐矢香、\*網 康至、\*須崎百合子、脇田隆字 (\*動物管理室)]

#### (10) Rat HEV はラット尿に分泌されない

最近、HEV は患者、サルの尿から検出された報告があったが、HEV は宿主の尿に分泌されるのは HEV 感染の共通現象かどうかを検証するため、我々は ratHEV に感染されたヌードラット及び Wistar rat の尿検体を用いて rat HEV 検査した結果、ウイルスが尿に出ないことが判明した。

[李天成、周顕鳳、\*片岡紀代、\*\*武田直和、脇田隆字 (\*感染病理部、\*\*大阪大学微生物病研究所、日本・タイ感染症共同研究センター)]

#### (11) 全国の飼育豚における HEV および抗 HEV 抗体保有状況の調査

全国 13 県の地方衛生研究所および食肉検査所と共同で、飼育豚の出荷時 (6 ヶ月齢) 血清を採取し、HEV および抗 HEV 抗体保有状況の調査を行った。地域に偏りなく状況は同様で、抗体保有率はほぼ 100%であったが、ウイルス核酸の検出率はほぼ 0%であり、日本全国で飼育豚は出荷までに HEV に感染するが、ウイルスは出荷時には血中からは排除されていることが確認された。

[石井孝司、吉崎佐矢香、李 天成、脇田隆字、高橋知子 (岩手県食肉衛生検査所)、斎藤博之、秋野和華子 (秋田県健康環境センター)、植木 洋 (宮城県保健環境センター)、小黒雅史 (新潟市食肉衛生検査所)、本谷 匠 (茨城県衛生研究所)、佐原啓二 (静岡県環境衛生科学研究所)、楠原 一 (三重県保険環境研究所)、金澤謙介 (岡山市食肉衛生検査所)、永田麻理子 (鳥取県食肉衛生検査所)、飛梅三喜 (徳島県食肉衛生検査所)、吉川 亮 (長崎県環境保健研究センター)、岩切 章 (宮崎県小林食肉衛生検査所)、加藤峰史 (沖縄県衛生環境

研究所) ]

(12) HEV の加熱抵抗性

HEV を種々の温度と時間で加熱後 PLC/PRF/5 細胞に感染させ、約 4 週間培養上清中のウイルス RNA 量を観察し、4 週間後もウイルスの増殖は観察されない場合に不活化されていると判断した。その結果、遺伝子型 G3 は 58°C 1 時間、60°C 30 分、65°C 5 分、75°C 1 分以上の条件で不活化された。遺伝子型 G4 についても一部の条件で試行したところ、75°C 1 分、65°C 5 分以上の条件で不活化した。現在、肉中に存在する HEV の不活化条件について検討している。

[今川稔文、李 天成、吉崎佐矢香、石井孝司、脇田隆字]

(13) HEV 感染モデル動物の確立

培養細胞由来の HEV (83-2 株) を子豚に対して経口的に投与した際においても感染が成立することを確認した。またその際、感染が成立するための最小感染量は  $10^6$  GE/ml であった。ウイルス投与量に依存するが、投与された個体において HEV は血中、糞便ともに投与後 11 日目より検出されることが明らかとなった。また、抗体価については投与後 17 日目より有意に検出されることが明らかとなった。

[鈴木 亨、宮崎綾子、大橋誠一 (動物衛生研究所) 今川稔文、李 天成、吉崎佐矢香、石井孝司、脇田隆字]

その他のウイルスに関する研究

(1) Polyomavirus NJPyV のウイルス様粒子の作製

Polyomavirus NJPyV はヒトの皮膚に紅斑性壊死を起こす新しいヒトポリオマウイルスである。本研究はウイルス抗体の検出法を樹立するため、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて NJPyV の VP1 を発現し、ウイルス様粒子 (VLP) の作製をした、さらに

NJPyV に対する抗体検出 ELISA 法を確立した。この抗体検出系は NJPyV の感染状況の解明に有用である。現在この検出系を用いて健常人における抗体保有率を検査している。

[李 天成、周顕鳳、\*片岡紀代 (感染病理部)、脇田隆字 (\*感染病理部)]

(2) Porcine bocavirus (PBoV) のウイルス様粒子の作製 PBoV はブタから分離された新しいウイルスであり、ブタの呼吸器及び消化器疾患と関連していると思われる。現在、PBoV の抗体検出方法がまだ樹立されていない。本研究はウイルス抗体の検出法を樹立するため、組換えバキュロウイルス発現システムを用いて PBoV の VP2 を発現し、ウイルス様粒子 (VLP) の作製をした、VLPs を用いてに対する抗体検出 ELISA 法を確立した。さらにこの抗体検出系を用いて日本におけるブタ及びイノシシの抗体保有状況を調査した。

[李 天成、張文静、\*片岡紀代 (感染病理部)、脇田隆字 (\*感染病理部)]

(3) 一回感染性ウイルスを用いたジカウイルス中和抗体アッセイ系の開発

感染性ジカウイルス (ZIKV) の代替として、ジカウイルスのエンベロープタンパク質をもつ一回感染性ウイルス (ZIK-SRIP) を作製した。段階希釈した中和活性を持つモノクローナル抗体および ZIKV 感染既往者血清は ZIKV と ZIK-SRIP について同等の中和活性を示した。この結果から ZIK-SRIP は生のウイルスの代替として中和アッセイに用いる事が出来ると考えられた。

[松田麻未、山中敦史 (タイ、マヒドン大)、小西英二 (タイ、マヒドン大)、高崎智彦 (ウイルス第一部)、鈴木亮介]

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Aoudjehane L, Bisch G, Scatton O, Granier C, Gaston J, Housset C, Roingeard P, Cosset FL, Perdigo F, Balladur P, Wakita T, Calmus Y, Conti F. Infection of

- Human Liver Myofibroblasts by Hepatitis C Virus: A Direct Mechanism of Liver Fibrosis in Hepatitis C. *PLoS One*. 2015 Jul 27;10(7):e0134141.
- 2) Arita M. Mechanism of poliovirus resistance to host phosphatidylinositol-4 kinase III beta inhibitor. *ACS Infectious Diseases*, 2: 140-148, 2016
  - 3) Chapellier B, Tange S, Tasaki H, Yoshida K, Zhou Y, Sakon N, Katayama K, Nakanishi A. Examination of a plasmid-based reverse genetics system for human astrovirus. *Microbiol Immunol*. 2015 Oct;59(10):586-96.
  - 4) Chu PS, Ebinuma H, Nakamoto N, Sugiyama K, Usui S, Wakayama Y, Taniki N, Yamaguchi A, Shiba S, Yamagishi Y, Wakita T, Hibi T, Saito H, Kanai T. Genotype-Associated Differential NKG2D Expression on CD56+CD3+ Lymphocytes Predicts Response to Pegylated-Interferon/Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C. *PLoS One*. 2015 May 12;10(5):e0125664.
  - 5) Hiramoto H, Dansako H, Takeda M, Satoh S, Wakita T, Ikeda M, Kato N. Annexin A1 negatively regulates viral RNA replication of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama*. 2015;69(2):71-8. PubMed PMID: 25899628.
  - 6) Ide T, Komoto S, Higo-Moriguchi K, Htun KW, Myint YY, Myat TW, Thant KZ, Thu HM, Win MM, Oo HN, Htut T, Wakuda M, Dennis FE, Haga K, Fujii Y, Katayama K, Rahman S, Nguyen SV, Umeda K, Oguma K, Tsuji T, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of Human G12P[6] and G12P[8] Rotavirus Strains that Have Emerged in Myanmar. *PLoS One*. 2015 May 4;10(5):e0124965.
  - 7) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C. Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol*. 2015. 1275-1285
  - 8) Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Yoshizane Y, Fujikawa K, Watashi K, Abe H, Wakita T, Hayes CN, Chayama K, Tateno C. Novel robust in vitro hepatitis B virus infection model using fresh human hepatocytes isolated from humanized mice. *Am J Pathol*. 2015 May;185(5):1275-85.
  - 9) Ishii K, Kiyohara T, Yoshizaki S, Kawabata K, Kanayama A, Yahata Y, Takahashi T, Kinoshita H, Saitou T, Sunagawa T, Oishi K, Uema M, Noda M, Wakita T. Epidemiological and genetic analysis of a 2014 outbreak of hepatitis A in Japan. *Vaccine*. 2015 Nov 9;33(45):6029-36.
  - 10) Islam MJ, Hikosaka K, Noritake H, Uddin MK, Amin MB, Aoto K, Wu YX, Sato E, Kobayashi Y, Wakita T, Miura N. Pol I-transcribed hepatitis C virus genome RNA replicates, produces an infectious virus and leads to severe hepatic steatosis in transgenic mice. *Biomed Res*. 2015;36(3):159-67. doi: 10.2220/biomedres.36.159. PubMed PMID: 26106045.
  - 11) Ito M, Tsuchiaka S, Naoi Y, Otomaru K, Sato M, Masuda T, Haga K, Oka T, Yamasato H, Omatsu T, Sugimura S, Aoki H, Furuya T, Katayama Y, Oba M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. *Infect Genet Evol*. 2016 Mar;38:90-5.
  - 12) Jiang X, Kanda T, Wu S, Nakamoto S, Nakamura M, Sasaki R, Haga Y, Wakita T, Shirasawa H, Yokosuka O. Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A Inhibits MG132-Induced Apoptosis of Hepatocytes in Line with NF- $\kappa$ B-Nuclear Translocation. *PLoS One*. 2015 Jul 2;10(7):e0131973.
  - 13) Kanayama A, Arima Y, Yamagishi T, Kinoshita H, Sunagawa T, Yahata Y, Matsui T, Ishii K, Wakita T, Oishi K. Epidemiology of domestically acquired hepatitis E virus infection in Japan: assessment of the nationally reported surveillance data, 2007-2013. *J Med Microbiol*. 2015 Jul;64(7):752-8.

- 14) [Kaneko M](#), [Watashi K](#), Kamisuki S, Matsunaga H, [Iwamoto M](#), Kawai F, [Ohashi H](#), [Tsukuda S](#), [Shimura S](#), [Suzuki R](#), [Aizaki H](#), Sugiyama M, Park SY, Ito T, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, [Wakita T](#). A Novel Tricyclic Polyketide, Vanitaracin A, Specifically Inhibits the Entry of Hepatitis B and D Viruses by Targeting Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide. *J Virol*. 2015 Dec 1;89(23):11945-53.
- 15) [Kataoka C](#), Suzuki T, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Nagata N, Ami Y, [Wakita T](#), [Nishimura Y](#), [Shimizu H](#). The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a Cynomolgus Monkey Model. *PLoS Pathog* 11: e1005033, 2015
- 16) [Kiyohara T](#), [Ishii K](#), Sugiyama M., Mizokami M. and [Wakita T](#). Seroepidemiological study of hepatitis B virus markers in Japan. *Vaccine*. 2015 Nov 9;33(45):6037-42.
- 17) Kobayashi M, Yoshizumi S, Kogawa S, Takahashi T, Ueki Y, Shinohara M, Mizukoshi F, Tsukagoshi H, Sasaki Y, Suzuki R, Shimizu H, Iwakiri A, Okabe N, Shirabe K, Shinomiya H, Kozawa K, Kusunoki H, Ryo A, Kuroda M, [Katayama K](#), Kimura H. Molecular Evolution of the Capsid Gene in Norovirus Genogroup I. *Sci Rep*. 2015 Sep 4;5:13806.
- 18) Komada K, Sugiyama M, Vongphrachanh P, Xeuatvongsa A, Khamphongphane B, Kitamura T, [Kiyohara T](#), [Wakita T](#), Oshitani H, Hachiya M. Seroprevalence of chronic hepatitis B, as determined from dried blood spots, among children and their mothers in central Lao People's Democratic Republic: a multistage, stratified cluster sampling survey. *Int J Infect Dis*. 2015 Jul;36:21-6.
- 19) Komoto S, Tacharoenuang R, Guntapong R, Ide T, Haga K, [Katayama K](#), Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Emergence and Characterization of Unusual DS-1-Like G1P[8] Rotavirus Strains in Children with Diarrhea in Thailand. *PLoS One*. 2015 Nov 5;10(11):e0141739.
- 20) [Kong L](#), [Fujimoto A](#), [Nakamura M](#), [Aoyagi H](#), [Matsuda M](#), [Watashi K](#), [Suzuki R](#), [Arita M](#), Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Sakamaki Y, Ichinose S, Suzuki T, [Wakita T](#), [Aizaki H](#). Prolactin regulatory element binding protein is involved in hepatitis C virus replication compartment by interacting with NS4B. *J Virol*. 2016 Jan 6;90(6):3093-111.
- 21) Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Suzuki T, Sato Y, Nakajima N, Koike S, Iwasaki T, Sata T, Yamashita T, Minagawa H, Taguchi F, Hasegawa H, [Shimizu H](#), Nagata N. Establishment of a panel of in-house polyclonal antibodies for the diagnosis of enterovirus infections. *Neuropathology* 35: 107-121, 2015
- 22) Kotani O, [Naeem A](#), Suzuki T, Iwata-Yoshikawa N, Sato Y, Nakajima N, Hosomi T, Tsukagoshi H, Kozawa K, Hasegawa H, Taguchi F, [Shimizu H](#), Nagata N. Neuropathogenicity of Two Saffold Virus Type 3 Isolates in Mouse Models. *PLoS One* 11: e0148184, 2016.
- 23) Kouwaki T, Okamoto T, Ito A, Sugiyama Y, Yamashita K, Suzuki T, Kusakabe S, Hirano J, Fukuhara T, Yamashita A, Saito K, Okuzaki D, [Watashi K](#), Sugiyama M, Yoshio S, Standley D, Kanto T, Mizokami M, Moriishi K, Matsuura Y. Hepatocyte factor JMJD5 regulates HBV replication through interaction with HBx. *J Virol*: 90. 3530-3542 (2016)
- 24) Lee EM, Alsagheir A, Wu X, Hammack C, McLauchlan J, [Watanabe N](#), [Wakita T](#), Kneteman NM, Douglas DN, Tang H. Hepatitis C Virus-Induced Degradation of Cell. Death-Inducing DFFA-Like Effector B Leads to Hepatic Lipid Dysregulation. *J Virol*. 2016 Mar 28;90(8):4174-85.
- 25) [Li T.C.](#), Kataoka M., Takahashi K., Yoshizaki S., Kato T., [Ishii K](#), Takeda N., Mishiro S. and [Wakita T](#). Generation of hepatitis E virus-like particles of two

- new genotypes G5 and G6 and comparison of antigenic properties with those of known genotypes. *Veterinary Microbiology* 178: 150-157 (2015)
- 26) Li T.C., Yang T., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Ishii K., Kishida N., Shirakura M., Asanuma H., Takeda N. and Wakita T. Ferret Hepatitis E Virus Infection Induces Acute Hepatitis and Persistent Infection in Ferrets. *Veterinary Microbiology*, 2016 Feb 1;183:30-6.
- 27) Li T.C., Yoshizaki S., Ami Y., Suzaki Y., Yang T., Takeda N., and Wakita T. Monkeys and rats are not susceptible to ferret hepatitis E virus infection. *Intervirology*. 58: 139-142 (2015)
- 28) Li T.C., Yoshizaki S., Yang T., Kataoka M., Nakamura T, Ami Y., Suzaki Y., Takeda N., and Wakita T. Production of infectious ferret hepatitis E virus in a human hepatocarcinoma cell line PLC/PRF/5. *Virus Research*. 213:283-8 (2016)
- 29) Li Y, Yamane D, Masaki T. Lemon SM. The yin and yang of hepatitis C: synthesis and decay of hepatitis C virus RNA. *Nat Rev Microbiol* 13(9): 544-558, 2015.
- 30) Liu X, Oka T. Wang Q. Genomic characterization of a US porcine kobuvirus strain. *Arch Microbiol*. 197: 1033-40, 2015
- 31) Liu Z., Guo F., Wang F., Li T.C. and Jiang W. 2.9 Å Resolution Cryo-EM 3D Reconstruction of Close-Packed Virus Particles. *Structure*. 24:319-28 (2016)
- 32) Lu L, An Y, Zou J, Gu L, Zhao Z, Zhang X, Li C, Kurihara C, Hokari R, Itakura J, Kurosaki M, Izumi N, Fu Y, Nakano T, Kato T. Negro F, Chen G. The evolutionary patterns of hepatitis C virus subtype 2a and 6a isolates linked to an outbreak in China in 2012. *Virology*, 485, 431-8, 2015.
- 33) Lu Z, Yokoyama M, Chen N, Oka T. Jung K, Chang KO, Annamalai T, Wang Q, Saif LJ. Mechanism of cell culture adaptation of an enteric calicivirus, porcine sapovirus Cowden strain. *J Virol*. 90 : 1345-58, 2016
- 34) Masaki T. Suzuki T. NS5A phosphorylation: its functional role in the life cycle of hepatitis C virus. *Future Virol* 10(6): 751–762, 2015.
- 35) Matsunaga H, Kamisuki S, Kaneko M, Yamaguchi Y, Takeuchi T, Watashi K. Sugawara F. Isolation and structure of vanitaracin A, a novel anti-hepatitis B virus compound from *Talaromyces* sp. *Bioorg Med Chem Lett*: 25. 2015. 4325-4328
- 36) Matsushima Y, Ishikawa M, Shimizu T, Komane A, Kasuo S, Shinohara M, Nagasawa K, Kimura H, Ryo A, Okabe N, Haga K. Doan HY, Katayama K. Shimizu H. Genetic analyses of GII.17 norovirus strains in diarrheal disease outbreaks from December 2014 to March 2015 in Japan reveal a novel polymerase sequence and amino acid substitutions in the capsid region. *Eurosurveillance* July 2, 1-6, 2015.
- 37) McGivern DR, Masaki T. Lovell W, Hamlett C, Saalau-Bethell S, Graham B. Protease inhibitors block multiple functions of the NS3/4A protease-helicase during the hepatitis C virus life cycle. *J Virol* 89(10): 5362-5370, 2015.
- 38) Miyakawa K, Matsunaga S, Watashi K. Sugiyama M, Kimura H, Yamamoto N, Mizokami M, Wakita T. Ryo A. Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin: A new perspective for antiviral cell therapy. *Oncotarget*: 6. 2015. 21840-21852
- 39) Motoya T., Nagata N., Komori H., Doi I., Kurosawa M., Keta T., Sasaki N and Ishii K. The high prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars in Ibaraki Prefecture, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77: 1705-1709 (2016)
- 40) Nagai M, Omatsu T, Aoki H, Kaku Y, Belsham GJ, Haga K, Naoi Y, Sano K, Umetsu M, Shiokawa M, Tsuchiaka S, Furuya T, Okazaki S, Katayama Y, Oba

- M, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. Identification and complete genome analysis of a novel bovine picornavirus in Japan. *Virus Res.* 2015 Aug 7;210:205-212.
- 41) Nagai M, Shimada S, Fujii Y, Moriyama H, Oba M, Katayama Y, Tsuchiaka S, Okazaki S, Omatsu T, Furuya T, Koyama S, Shirai J, Katayama K, Mizutani T. H2 genotypes of G4P[6], G5P[7], and G9[23] porcine rotaviruses show super-short RNA electropherotypes. *Vet Microbiol.* 2015 Apr 17;176(3-4):250-6.
- 42) Nemoto M, Nagai M, Tsunemitsu H, Omatsu T, Furuya T, Shirai J, Kondo T, Fujii Y, Todaka R, Katayama K, Mizutani T. Whole-genome sequence analysis of G3 and G14 equine group A rotaviruses isolated in the late 1990s and 2009-2010. *Arch Virol.* 2015 May;160(5):1171-9.
- 43) Nishikori S, Takemoto K, Kamisuki S, Nakajima S, Kuramochi K, Tsukuda S, Iwamoto M, Katayama Y, Suzuki T, Kobayashi S, Watashi K, Sugawara F. Anti-hepatitis C virus natural product from a fungus, *Penicillium herquei*. *J Nat Prod.* 79: 442-446 (2016)
- 44) Nishimura Y, McLaughlin NP, Pan J, Goldstein S, Hafenstein S, Shimizu H, Winkler JD, Bergelson JM. The Suramin Derivative NF449 Interacts with the 5-fold Vertex of the Enterovirus A71 Capsid to Prevent Virus Attachment to PSGL-1 and Heparan Sulfate. *PLoS Pathog* 11: e1005184, 2015
- 45) Okitsu S, Khamrin P, Hanaoka N, Thongprachum A, Takanashi S, Fujimoto T, Mizuguchi M, Shimizu H, Hayakawa S, Maneekarn N, Ushijima H. Cosavirus (family Picornaviridae) in pigs in Thailand and Japan. *Arch Virol* 161: 159-163, 2016
- 46) Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Tanaka T, Yamashita A, Yasumoto J, Chen W, Okamoto T, Maekawa S, Watashi K, Wakita T, Ryo A, Suzuki T, Matsuura Y, Enomoto N, Moriishi K. Hepatitis B virus efficiently infects non-adherent hepatoma cells via human sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *Sci Rep:* 5. 2015. 17047
- 47) Otomaru K, Naoi Y, Haga K, Omatsu T, Uto T, Koizumi M, Masuda T, Yamasato H, Takai H, Aoki H, Tsuchiaka S, Sano K, Okazaki S, Katayama Y, Oba M, Furuya T, Shirai J, Katayama K, Mizutani T, Nagai M. Detection of novel kobu-like viruses in Japanese black cattle in Japan. *J Vet Med Sci.* 2016 Feb;78(2):321-4.
- 48) Ricco G., Bonino F., Lanza M., Scatena F., Alfieri C.M., Messa P., Marchisio E., Mascolo G., Romanò L., Galli C., Li T.C., Wakita T, Miyamura T., Brunetto M.R. New immunoassays for total, IgA and IgM antibodies against hepatitis E virus: Prevalence in Italian blood donors and patients with chronic liver or kidney diseases. *Dig Liver Dis.* 2016 May;48(5):536-41. Epub 2016 Feb 10.
- 49) Sankhyan A, Sharma C, Dutta D, Sharma T, Chosdol K, Wakita T, Watashi K, Awasthi A, Acharya S, Khanna N, Tiwari A, Sinha S. Inhibition of preS1-hepatocyte interaction by an array of recombinant human antibodies from naturally recovered individuals. *Sci Rep:* 6. 21240 (2016)
- 50) Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, Omatsu T, Oba M, Ochiai H, Kato T, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog.* e1005441 (2016).
- 51) Shima R., Li T.C., Sendai Y., Kataoka C., Mori Y., Abe T., Takeda N., Okamoto T. and Matsuura Y. Production of hepatitis E virus-like particles presenting multiple foreign epitops by co-infection of recombinant baculovirus. *Sci Rep.* 6:21638 (2016)
- 52) Shirasago Y, Shimizu Y, Tanida I, Suzuki T, Suzuki R, Sugiyama K, Wakita T, Hanada K, Yagi K, Kondoh M, Fukasawa M. Occludin-Knockout Human Hepatic Huh7.5.1-8-Derived Cells Are Completely Resistant to Hepatitis C Virus Infection. *Biol Pharm Bull.*



- 5:839-848. (2016).
- 53) Suzuki R, Saito K, Matsuda M, Sato M, Kanegae Y, Shi G, Watashi K, Aizaki H, Chiba J, Saito I, Wakita T, Suzuki T. Single-domain Intrabodies against HCV Core Inhibit Viral Propagation and Core-induced NF- $\kappa$ B Activation. *J Gen Virol*. 2016 Apr;97(4):887-92.
- 54) Tacharoenmuang R, Komoto S, Guntapong R, Ide T, Haga K, Katayama K, Kato T, Ouchi Y, Kurahashi H, Tsuji T, Sangkitporn S, Taniguchi K. Whole Genomic Analysis of an Unusual Human G6P[14] Rotavirus Strain Isolated from a Child with Diarrhea in Thailand: Evidence for Bovine-To-Human Interspecies Transmission and Reassortment Events. *PLoS One*. 2015 Sep 30;10(9):e0139381.
- 55) Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Masaki T, Murayama A, Yamada N, Sugiyama R, Tsukuda S, Watashi K, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Amino Acid Polymorphisms in Hepatitis C Virus Core Affect Infectious Virus Production and Major Histocompatibility Complex Class I Molecule Expression. *Sci Rep*: 2015. 13994 (2015)
- 56) Tran DN, Trinh QD, Pham NT, Pham TM, Ha MT, Nguyen TQ, Okitsu S, Shimizu H, Hayakawa S, Mizuguchi M, Ushijima H. Human rhinovirus infections in hospitalized children: clinical, epidemiological and virological features. *Epidemiology and Infection* 144: 346-354, 2016
- 57) Watashi K, Wakita T. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus Entry, Species Specificity, and Tissue Tropism. *Cold Spring Harb Perspect Med*: 5. 2015. a021378
- 58) Wu FT, Chen HC, Yen C, Wu CY, Katayama K, Park Y, Hall AJ, Vinjé J, Huang JC, Wu HS. Epidemiology and molecular characteristics of norovirus GII.4 Sydney outbreaks in Taiwan, January 2012-December 2013. *J Med Virol*. 2015 Sep;87(9):1462-70.
- 59) Yamashita A, Fujimoto Y, Tamaki M, Setiawan A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Toyama M, Baba M, de Voogd NJ, Maekawa S, Enomoto N, Tanaka J, Moriishi K. Identification of Antiviral Agents Targeting Hepatitis B Virus Promoter from Extracts of Indonesian Marine Organisms by a Novel Cell-Based Screening Assay. *Mar Drugs*. 2015 Nov 6;13(11):6759-73. doi: 10.3390/md13116759. PubMed PMID: 26561821.
- 60) Yumiketa Y, Narita T, Inoue Y, Sato G, Kamitani W, Oka T, Katayama K, Sakaguchi T and Tohya Y. Nonstructural protein p39 of feline calicivirus suppresses host innate immune response by preventing IRF-3 activation. *Veterinary Microbiology*. 2016 Mar 15;185:62-7.
- 61) Zhang W., Sano N., Kataoka M., Ami Y., Suzaki Y., Wakita T, Ikeda H. and Li T.C. Virus-Like Particles of Porcine Bocavirus Generated by Recombinant Baculoviruses Can be Applied to Sero-epidemic Studies. *Virus Res*. 217:85-91 (2016)
- 62) Zhang Y, Yan D, Zhu S, Nishimura Y, Ye X, Wang D, Jorba J, Zhu H, An H, Shimizu H, Kew O, Xu W. An Insight into Recombination with Enterovirus Species C and Nucleotide G-480 Reversion from the Viewpoint of Neurovirulence of Vaccine-Derived Polioviruses. *Scientific Reports* 5: 17291, 2015
- 63) Zhou X., Kataoka M., Liu Z., Takeda N., Wakita T, Li T.C. Characterization of self assembled virus-like particles of dromedary camel hepatitis e virus generated by recombinant baculoviruses. *Virus Research*, 6; 210: 8-17 (2015)
- 64) Zhou X, Xu L, Wang W, Watashi K, Wang Y, Sprengers D, de Ruiter PE, van der Laan LJ, Metselaar HJ, Kamar N, Peppelenbosch MP, Pan Q. Disparity of basal and therapeutically activated interferon signalling in constraining hepatitis E virus infection. *J Viral Hepat*: 23. 294-304 (2016)

2. 和文発表

- 1) 相崎英樹, 脇田隆宇. C型肝炎ウイルスの複製・増殖のメカニズム. 医薬ジャーナル (0287-4741)52巻1号 Page67-70(2016.01)
- 2) 安藤克幸、伊藤雅、伊東愛梨、内野清子、岡山文香、内山友里恵、小澤広規、北川和寛、葛口剛、後藤明子、下野尚悦、神保達也、高橋雅輝、滝澤剛則、筒井理華、中野守、濱崎光宏、堀田千恵美、松岡保博、山崎謙治、中田恵子、吉田弘 : 平成26年度感染症流行予測調査事業ポリオ環境水調査にて検出されたウイルスについて. 病原微生物検出情報 37; 27-29, 2016
- 3) 石井孝司 A型肝炎 救急医学 39: 1434-1437 (2015)
- 4) 石井孝司 A型肝炎ウイルスのウイルス学的特徴 日本臨床 73: 576-583 (2015)
- 5) 石井孝司 A型肝炎の現状 臨床検査 59: 1358-1364 (2015)
- 6) 石井孝司 A型肝炎の分子疫学的解析 肝胆膵 71: 983-989 (2015)
- 7) 石井孝司、今川稔文 生肉食とE型肝炎 日本臨床 73: 693-698 (2015)
- 8) 片山和彦 BIO Clinica 新興・再興感染症-感染予防ワクチン ノロウイルス最新の研究動向
- 9) 片山和彦 Luncheon Seminar Report No.1 ノロウイルス-感染制御を目指した研究の歩みと最新の成果- デンカ生研、p1-4、リーフレット、2015/02/24
- 10) 片山和彦 ウイルス性胃腸炎 SRL社 宝函 vol. 35, No. 4, p23-34、2015.
- 11) 片山和彦 キューピーニュース ノロウイルス予防と対策 499号 9月 2015
- 12) 片山和彦 月刊HACCP ノロウイルス予防と対策 12月 vol.21 p20-27, 2015
- 13) 片山和彦 最新医学 ノロウイルスのウイルス学的基礎研究・最近のトピックス vol.70., 11月号増刊号 p88-96, 2015
- 14) 片山和彦 木村博一 ノーウォークウイルス (ノロウイルス) の遺伝子型 2015年改訂版 IASR ノロウイルス特集号 Sep 8, 2015.
- 15) 齊藤 恭子, 白砂 圭崇, 鈴木 哲朗, 相崎 英樹, 花田 賢太郎, 脇田 隆宇, 西島 正弘, 深澤 征義: スクアレン合成酵素阻害剤のC型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス効果について. 脂質生化学研究 (0285-1520)57巻 Page247-250(2015.05)
- 16) 佐藤 弘、多屋馨子、清水博之: 2011~2014年度ポリオ感受性調査実施都道府県(北海道、山形県、群馬県、千葉県、東京都、富山県、愛知県、山口県、愛媛県): 不活化ワクチン導入前後のポリオの予防接種状況および抗体保有状況-感染症流行予測調査より. 病原微生物検出情報 37: 26-27, 2016
- 17) 清水博之、「Q25 弱毒生ポリオワクチン株での麻痺の副反応としてワクチン関連麻痺が起きることがありますが、ワクチン由来株による麻痺とはどのように区別するのですか」の項を担当、まるわかりワクチン Q&A、中野貴司編、141-142, 日本医事新報社、東京、2015
- 18) 清水博之、「Q26 不活化ポリオワクチンの成分に表示されているD抗原量(D antigen unit)とは何のことですか」の項を担当、まるわかりワクチン Q&A、中野貴司編、143-145, 日本医事新報社、東京、2015
- 19) 清水博之、「急性灰白髄炎」の項を担当、岡部信彦、岩本愛吉、大西真、西條政幸、谷口清洲、野崎智義、宮崎義継、編、感染症予防必携(第3版)、220-224、日本公衆衛生協会、2015
- 20) 清水博之、厚生労働省健康局結核感染症課: ポリオウイルスのバイオリスク管理. 病原微生物検出情報 37: 22-24, 2016
- 21) 清水博之. 日本ウイルス学会における利益相反の開示と申告について. ウイルス 65: 119-125, 2015
- 22) 清水博之: WHOポリオ根絶最終段階戦略とその実施計画2013-2018の進捗. 病原微生物検出情報 37: 19-20, 2016

- 23) 清水博之: エンテロウイルスワクチン開発の現状. 外来小児科 18, 196-201, 2015
- 24) 清水博之: ポリオウイルス病原体バイオリスク管理に関するWHO行動計画(GAP III)と今後の課題. JBSA Newsletter 6, 2016
- 25) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画- 最近の動向-. 感染・炎症・免疫 45, 312-322, 2015
- 26) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画の現状と最終段階戦略. 化学療法の領域 31, 85-92, 2015
- 27) 白土東子: ノロウイルスと血液型抗原 最新医学 第70巻 11月増刊号, 2015
- 28) 鈴木哲朗, 石井孝司: A型肝炎ウイルス(HAV)の疫学 日本臨床 73: 571-575 (2015)
- 29) 筒井理華, 武差愛美, 坂 恭平, 藤田真司, 鈴木豊, 吉田 弘: エンテロウイルス D68型が検出された麻痺症状を呈する小児症例を含む2症例—青森県. 病原微生物検出情報 37, 12-13, 2016
- 30) 中村 朋史, 西村順裕, 有田峰太郎, 吉田 弘, 和田純子, 清水博之: ワクチン由来ポリオウイルスによるポリオ流行の現状とリスク. 病原微生物検出情報 37: 24-26, 2016
- 31) 中村朋史, 清水博之: エンテロウイルス D68 感染症. 臨床と微生物 42, 69-75, 2015
- 32) 藤井克樹: ロタウイルスゲノム解析における次世代シーケンサーの有用性 臨床とウイルス 2015, 43(3) 100-107.
- 33) 政木隆博, Lemon SM. microRNA-122によるC型肝炎ウイルスの複製制御. ウイルス 65(2): 277-286, 2015.
- 34) 政木隆博, 加藤孝宣. マイクロRNA-122によるC型肝炎ウイルスゲノム複製の制御機構. Annual Review消化器2016 (中外医学社): 68-73, 2016.
- 35) 松島勇紀 石川真理子 清水智美 駒根綾子 清水英明 松尾千秋 三崎貴子 岡部信彦 篠原美千代 峯岸俊貴 小川泰卓 粕尾しず子 中沢春幸 水越文徳 鈴木尚子 船渡川圭次 梁 明秀 木村博一 長澤耕男 芳賀 慧 Doan Hai Yen 片山和彦 新規遺伝子型ノロウイルス GII.P17-GII.17の流行 IASR Vol. 36, No. 9 (No. 427) Sep 2015
- 36) 三木元博, 片山和彦 臨床とウイルス ディープシーケンス法を用いたノロウイルスの分子疫学、進化の研究 vol. 43, 3 p92-99, 2015
- 37) 村山麻子, 加藤孝宣. HCV J6CF株培養細胞増殖とウイルス遺伝子変位の同定. 日本臨床 新ウイルス性肝炎学 -最新の基礎・臨床研究情報- 73 (Supp19) : 105-110, 2015
- 38) 山田典栄, 小林稔, 奥瀬千晃, 鈴木通博, 今井康晴, 四柳宏, 加藤孝宣, 安田清美. ペグインターフェロン・リバビリン治療にて著効と判定された9年後にHCV陽性および肝細胞癌と診断された1例. 肝臓 56 (11): 610-616, 2015.
- 39) 吉田弘, 伊藤俊之, 梅木和宣, 中嶋健介: 平成26年5月に実施した病原体サーベイランス等に関する調査より—地方衛生研究所における検査実施体制について. 病原微生物検出情報 36 : 114-116, 2015
- 40) 脇田隆字. 肝炎ウイルス研究の進歩 培養細胞を用いた肝炎ウイルス複製 肝炎ウイルス培養系と抗ウイルス薬開発への応用. 日本臨床 (0047-1852)73 巻増刊 9 新ウイルス性肝炎学 Page63-68(2015.12)
- 41) 脇田隆字. 肝炎ウイルス総論 基礎・疫学・臨床の接点 C型肝炎ウイルス感染培養系から抗ウイルス薬へ. 最新医学(0370-8241)70 巻 9号 Page1748-1755(2015.09)
- 42) 脇田隆字. 創薬を目的とした肝炎ウイルス学. 細胞(1346-7557)47巻11号Page530-533(2015.10)
- 43) 渡士幸一, 脇田隆字. B型肝炎ウイルスエントリーについて:メカニズムとその阻害. 肝胆膵 71: 1053-1058 (2015)
- 44) 渡士幸一, 脇田隆字. B型肝炎ウイルス研究の進歩. Pharma Medica 4巻2号Page15-18(2016.02)
- 45) 渡士幸一, 脇田隆字. 新規B型肝炎抗ウイルス薬開発の現状. カレントセラピー 33巻9号Page903-907(2015.09)

- 46) 渡士幸一. HBV の細胞内侵入機構とこれを標的とした創薬. 日本臨床 in press: (2015)
- 47) 国立感染症研究所 感染症疫学センター、ウイルス第二部 : エンテロウイルス D68 型 (EV-D68) に関する国内の疫学情報のまとめ (更新) (2016 年 1 月 20 日現在) 病原微生物検出情報 37: 33-35, 2016
- 3.その他
- 1) 岡智一郎 食品衛生検査指針 微生物編 2015 サポウイルス p684-692. 2015. 公益社団法人 日本食品衛生協会
4. (新聞) 指導、監修
- 1) 片山和彦 少年写真新聞 中学保健ニュース ノロウイルスの感染経路を知ろう 2014年12月18日
- 2) 片山和彦 少年写真新聞 高校保健ニュース ノロウイルスの感染経路を知ろう 2014年12月18日
- II. 学会発表
- 国際学会
- 1) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Moriishi K, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Development of a cell culture and infection system for hepatitis B virus using 3D cultured immortalized human hepatocytes. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 2) Aly HH, Chayama K, Watashi K, Wakita T. The regulation of Hepatitis B virus-replication by the RNA exosome complex. 3rd Japan-Taiwan research symposium on the study of hepatitis B virus. April 11-12, 2015. Tokyo, Japan.
- 3) Aly HH, Suzuki J, Watashi K, Chayama K, Kato T, Wakita T. The regulation of HBV-replication by the RNA exosome complex. *ibid*.
- 4) Aly HH, Watashi K, Chayama K, Kato T, Wakita T. SKIV2L-dependent HBV-RNS degradation by the RNA-Exosome, a new anti-HBV host mechanism. 2015 International Meeting, molecular Biology of Hepatitis B virus. October 4-8, 2015. Bad Nauheim, Germany.
- 5) Aly HH, Watashi K, Chayama K, Kato T, Wakita T. SKIV2L/RNA exosome mediated regulation of hepatitis B virus. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016. Tokyo, Japan.
- 6) P Briolotti, S Kim, C Duret, P Roingard, JM Fabre, J Ramos, D Larrey, M Daujat-Chavanieu, T Wakita, C Gondeau. Cell culture-derived S310 particles: a new tool for studying Hepatitis C Virus Genotype 3 in primary cultures of human adult hepatocytes. 22st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, France, Oct9-13, 2015 ポスター
- 7) Y Fujii : Molecular epidemiological study of rotavirus based on full genome sequencing. NIID International Seminar on Infectious Diseases (東京) 2016 年 1 月 26-27 日
- 8) M Fukasawa, Y Shimizu, Y Shirasago, T Suzuki, T Wakita, K Hanada, K Yagi, M Kondoh. Prevention of Hepatitis C virus infection by monoclonal antibodies against occluding. HEP DART 2015, Wailea, Hawaii, Dec 6-10, 2015
- 9) Fukasawa M, Shimizu Y, Shirasago Y, Watashi K, Tanaka Y, Wakita T, Kondoh M, Yagi K, Hanada K. Inhibition of hepatitis B virus infection by docosahexaenoic acid in cultured cells. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 10) Fukushima S, Nakano T, Shimizu H, Hamada: Immunogenicity of Booster Doses of the Inactivated Polio Vaccine among Japanese adult travelers. The 14th Conference of International society of Travel Medicine, Québec City, Canada, May 2015

- 11) Fukushima S., Nakano T., Kiyohara T., Ishii K. and Hamada A. Immunogenicity of Booster Vaccination with an Aluminum-absorbed Hepatitis A Vaccine after Primary Immunization with Aluminum-free Japanese Hepatitis A Vaccine. **9th Vaccine & ISV Congress. Seoul, South Korea**, October 18-20, 2015
- 12) Ishida T, Kubota T, Shirato H. Computational modeling of carbohydrate recognition in norovirus capsid protein with lewis antigen. THE INTERNATIONAL CHEMICAL CONGRESS OF PACIFIC BASIN SOCIETIES 2015. in Honolulu, Hawaii, USA, Nov, 2015
- 13) Ito K, Yoneda M, Angata K, Watashi K., Wakita T., Iijima S, Tanaka Y, Tong S, Kuno A, Sugiyama M, Mizokami M, Narimatsu H. Investigation of the mechanism of interaction between host glycosylation system and hepatitis B virus replication system. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 14) Iwami S, Tanaka Y, Wakita T., Watashi K. Quantifying activity optimizes drug combinations against hepatitis C virus infection. 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct, 2015, Strasbourg(France)
- 15) Johne R, Yang T, Yoshizaki S., Ami Y, Suzaki Y, Ishii K., Haga K., Nakamura T, Ochiai S, Wakita T., Li TC. Establishment of a reverse genetics system for rat hepatitis E virus. 25th Annual Meeting of the Society for Virology. Bochum, Germany, March 18–21 2015
- 16) Kaneko M., Watashi K., Kamisuki S, Matsunaga H, Iwamoto M., Kawai F, Ohashi H., Tsukuda S., Shimura S., Suzuki R., Aizaki H., Sugiyama M, Park SY, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Sureau C, Wakita T. Identification of a new tricyclic polyketide, vanitaracin A, which inhibits the entry of HBV, HDV, and nucleoside analog-resistant HBV though targeting NTCP. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 17) Kato T. Amino Acid Polymorphism in HCV Core Affects Infectious Virus Production and MHC Class I Expression. KSBMB International Conference 2015. May 12-14, Seoul, Korea.
- 18) L Kong., A Fujimoto., H Aoyagi., M Matsuda., K Watashi., R Suzuki., S Yamagoe, N Dohmae, T Suzuki, T Suzuki, T Wakita., H Aizaki. Prolactin regulatory element binding protein promotes the formation of hepatitis C virus membranous replication compartment by interacting with NS4B. 22st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, France, Oct9-13, 2015
- 19) Masaki T., Kato T., Wakita T. Suppression of host cellular microRNA functions by HCV infection and its implication in the aggressiveness of hepatocellular carcinoma cells. *ibid.*
- 20) Matsunaga S, Miyakawa K, Watashi K., Sugiyama M, Mizokami M, Wakita T., Ryo A. Development of anti-HBs monoclonal antibody targeting HBs-NTCP interaction. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 21) Miyakawa K, Matsunaga S, Watashi K., Sugiyama M, Mizokami M, Wakita T., Ryo A. Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin. *ibid.*
- 22) Moyo B, Nicholson S, Roelofse I, Bloom K, Mussolino C, Cathomen T, Watashi K., Ely A, Arbutnot P. AAV-delivered engineered repressor transcription activator-like effectors (rTALEs) inactivate hepatitis B virus replication in hNTCP cells and in mice. *ibid.*
- 23) Murakami K., Ettayebi K, Tenge VR, Neill FH, Crawford SE, Atmar RL and Estes MK. Replication

- of GII.3 human norovirus in human intestinal enteroids. Seventh Annual Frontiers in Digestive Diseases Symposium, Houston (USA), Feb, 2016
- 24) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Essential Factors for Reconstitution of Entire Life Cycle of Hepatitis C Virus in Monkey Kidney Derived Cell Line. 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 13-17, 2015 San Francisco, USA.
- 25) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Establishment of Novel Hepatitis C Virus Culture System with Vero Cells. 22nd International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 9-13, 2015. Strasbourg, France.
- 26) Murayama A, Sugiyama N, Wakita T, Kato T. Host factors for HCV replication and infectious virus production in Vero cells. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016 Tokyo, Japan.
- 27) Nicholson S, Moyo B, Bloom K, Mussolino C, Cathomen T, Watashi K, Ely A, Arbuthnot P. Anti-HBV talens delivered by recombinant adeno-associated viral vectors (rAAV) efficiently inhibit HBV replication in vivo and in vitro. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 28) Nishimura Y, McLaughlin N, Pan J, Goldstein S, Hafenstein S, Shimizu H, Winkler JD, Bergelson JM: The suramin derivative NF449 interacts with the 5-fold vertex of the EV71 capsid to prevent virus attachment to PSGL-1 and heparan sulfate. 10th Asia-Pacific Congress of Medical Virology 2015, Taipei, 2015. 10. 15-18
- 29) Nitta S, Asahina Y, Wakita T, Kato T. Effects of Resistance Mutations of NS5A Inhibitor on Viral Production and Susceptibility to Anti-HCV Reagents in Recombinant Hepatitis C Viruses with NS5A of Genotype 1b. 66th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, November 13-17, 2015 San Francisco, USA.
- 30) Nitta S, Asahina Y, Wakita T, Kato T. In vitro characterization and drug sensitivity analysis for HCV NS5A resistance-associated variants 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016. Tokyo, Japan.
- 31) Okamura H, Akahori Y, Kim S, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Long chain saturated fatty acid contributes to efficient egression of hepatitis B virus particles. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 32) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Japanese encephalitis virus (JEV)-subviral particles harboring HCV neutralization epitopes elicit neutralizing antibodies against JEV and HCV. 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Oct, 2015, Strasbourg(France)
- 33) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Watashi K, Aizaki H, Kato T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Bivalent vaccine antigen for Japanese encephalitis virus and Hepatitis C virus. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016 Tokyo, Japan.
- 34) Sato S, Li K, Kameyama T, Hayashi T, Ishida Y, Murakami S, Watanabe T, Iijima S, Sakurai Y, Watashi K, Tsutsumi S, Sato Y, Akita H, Wakita T, Rice Cm, Harashima H, Kohara M, Tanaka Y, Takaoka A. Dual function of RIG-I as innate antiviral mediator against hepatitis B virus. 2015 International Meeting of Molecular Biology of

- Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 35) Shimizu H: Current Outbreaks of Acute Flaccid Paralysis in Laos and Japan. NIID International Seminar on Infectious Diseases, Tokyo, 26 January, 2016
- 36) Y Shimizu, Ya Shirasago, M Kondoh, T Suzuki, T Wakita, K Hanada, K Yagi, M Fukasawa. Inhibition of Hepatitis C virus infection by anti-occludin monoclonal antibodies. 22st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, France, Oct9-13, 2015 ポスター
- 37) Shimura S, Watashi K, Sluder A, Peel M, Kawai F, Sugiyama M, Park SY, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Identification of HBV entry inhibitors, based on the cyclosporin structure. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 38) Shiota T. HEV methodology group, International workshop on Foodborne Viruses (FSA-EFSA Foodborne Viruses Workshop), Royal Society in London, UK, from 23-25 February 2016
- 39) Y Shirasago, Y Shimizu, I Tanida, T Suzuki, T Wakita, K Hanada, K Yagi, M Kondoh, M Fukasawa. Establishment and characterization of occludin knock-out human hepatic Huh7.5.1 cells. 22st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, France, Oct9-13, 2015
- 40) Someya Y. FSA-EFSA Workshop on Foodborne Viruses 2016 (FSA (Food Standards Agency)、および、EFSA (European Food Safety Authority)主催) 2016年2月23日～25日 ロンドン
- 41) Sugiyama R, Sugiyama N, Murayama A, Tasaka-Fujita M, Yamada N, Nitta S, Masaki T, Ryo A, Wakita T, Kato T. Amino acid substitutions in ISDR of HCV-NS5A affect infectious virus production and ISG induction. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016 Tokyo, Japan.
- 42) Suzuki J, Aly HH, Wakita T. Analyzing RNA exosome mediated HBV-RNA degradation mechanism. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016 Tokyo, Japan.
- 43) Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Masaki T, Murayama A, Wakita T, Shin EC, Kato T. Amino acid polymorphisms in HCV core affect infectious virus production and MHC class I molecule expression. 22nd International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 9-13, 2015. Strasbourg, France.
- 44) Toyama M, Hamasaki T, Okamoto M, Watashi K, Wakita T, Baba M. Pyrimidotriazinone derivatives as novel inhibitors of hepatitis B virus core assembly. 2015 International Meeting of Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Oct, 2015, Bad Nauheim(Germany)
- 45) Tsukuda S, Watashi K, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Tanaka Y, Wakita T. Cilnidipine inhibits the early phase of HBV infection in a NTCP-independent mechanism. *ibid*.
- 46) T Wakita, L Kong, H Aizaki, HCV Biology in the future: Molecular mechanisms of HCV membrane replication complex formation. APASL 2016, 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Tokyo, Feb 20-24, 2016
- 47) T Wakita, L Kong, H Aizaki, Molecular mechanisms of hepatitis C virus membrane replication complex formation. 13th IGAKUKEN International Symposium on "Molecular Basis of Viral Disease", 東京都医学総合研究所、(2015. 11.20)
- 48) T Wakita, L Kong, H Aizaki. Molecular mechanisms of hepatitis C virus membrane replication complex formation. Chinese HCV meeting. Guangzhou,

- China, January 7-9, 2016
- 49) T Wakita, Virology of Hepatitis B and C viruses. APASL 2016, 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, Tokyo, Feb 20-24, 2016
- 50) T Wakita. Translational researches on HBV. APDW 2015. Taipei, Taiwan, Dec 3-6, 2015
- 51) N Watanabe, T Date, H Aly, H Aizaki, T Wakita. Analysis of E1(282-311) region as potential target for vaccine development. 22st International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, France, Oct9-13, 2015
- 52) Watashi K. Hepatitis C virus cell culture system identifies fungi-derived NeoB as a liver X receptor inhibitor. Pacificchem 2015, Dec, 2015, Honolulu(USA)
- 53) K Watashi, S Tsukuda, S Shimura, M Kaneko, A Sluder, M Peel, S Kamisuki, S Matsunaga, R Morishita, Y Futamura, Y Kondoh, R Suzuki, H Aizaki, M Sugiyama, K Borroto-Esoda, A Ryo, F Sugawara, H Osada, Y Tanaka, M Mizokami, T Wakita. Identification of NTCP-targeting small molecules that inhibit HBV entry by cell-based and in vitro technologies. 2015 International meeting on the Molecular biology of Hepatitis B Viruses, Dolce Bad Nauheim, Germany, Oct 4-8, 2015 口頭発表
- 54) Yamada N, Kobayashi M, Okuse C, Suzuki M, Imai Y, Yotsuyanagi H, Kato T, Yasuda K. HCV reactivation and HCC development after achievement of HCV RNA negative by Peg-IFN/Rbv therapy. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016 Tokyo, Japan.
- 55) Yokokawa H, Higashino A, Suzuki S, Suzuki T, Akari H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Neutralizing antibody induction by vaccination of cell culture-generated hepatitis C virus particles in non-human primate model. 22nd International Symposium on Hepatitis C and Related Viruses, October 9-13, 2015. Strasbourg, France.
- 56) Yokokawa H, Higashino A, Suzuki S, Suzuki T, Akari H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Vaccination study of cell culture-generated hepatitis C virus particles in non-human primate model. 25th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver, February 20-24, 2016 Tokyo, Japan.
- ## 2. 国内学会
- 1) Akahori Y, Kato H, Fujita T, Moriishi K, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Development of a cell culture and infection system for hepatitis B virus using 3D cultured non-neoplastic HuS-E/2 cells. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場、(2015. 11.22-24)
- 2) Aly HH, Watashi K, Chayama K, Kato T, Wakita T. SKIV2L-mediated RNA-exosome regulation of HBV replication. 同上
- 3) Asabe S, Kato T, Nakamura I. Possible contribution of TNF $\alpha$  producing T cells in drug-induced liver injury. International Session 第19回日本肝臓学会大会. 東京, (2015. 10. 8-9)
- 4) YH Doan, K Haga, A Fujimoto, Y Fujii, R Takai-Todaka, T Oka, S Yoshizumi, N Shigemoto, R Okamoto, K Shirabe, M Shinohara, H Shinomiya, N Tanaka-Sakon K Katayama : Genetic analyses of human group C rotaviruses detected in Japan between 2005 and 2012 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場、(2015. 11.22-24)
- 5) Y Fujii, YH Doan, T Nakagomi, O Nakagomi, K Katayama : Molecular epidemiology of rotaviruses based on nearly-full length sequencing across Japan in 2014. 同上
- 6) Guoli S, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. The 3' untranslated region is required for Hepatitis C virus genome encapsidation. 同上



- 7) Iwamoto M, Watashi K, Sugiyama M, Suzuki R, Aizaki H, Tanaka Y, Mizokami M, Ohtani N, Koizumi O, Wakita T. Multimerization of hepatitis B virus core protein regulated by microtubules. 同上
- 8) Kaneko M, Watashi K, Kamisuki S, Matsunaga H, Iwamoto M, Kawai F, Ohashi H, Tsukuda S, Shimura S, Suzuki R, Aizaki H, Sugiyama M, Park Sy, Ohtani N, Sugawara F, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. A new fungi-derived vanitaracin A specifically inhibits the entry of hepatitis B and D viruses through interacting with NTCP. 同上
- 9) K Kondo, M Ono, T Tsugawa, H Tsutsumi, Y Fujii, K Katayama : Molecular characterization of G8P[8] rotavirus strains emerge in Hokkaido in 2014. 同上
- 10) Kong L, Aoyagi H, Matsuda M, Fujimoto A, Watashi K, Suzuki R, Yamagoe S, Dohmae N, Suzuki T, Sakamaki Y, Ichinose S, Suzuki T, Wakita T, Aizaki H. Surfeit 4 is involved in HCV replication by interacting with NS4B. 同上
- 11) Kotani O, Yokoyama M, Suzuki T, Iwata-Yosikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Sato H, Nagata N: A molecular mechanism of adaptive evolution of Saffold virus type 3 in cerebellum of mouse. 同上
- 12) Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki ., Yoshizaki S, Ishii K, Haga K, Nakamura T, Ochiai S, Takeda N. Johne R. Wakita T. A reverse genetic system to explore the function of rat hepatitis E virus ORF4. 同上
- 13) Masaki T, Kato T, Wakita T. Inhibition of Host Cellular microRNA Functions by Hepatitis C Virus Infection. 同上
- 14) Nagata N, Ushioda W, Nakamura T, Iizuka S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Simizu H, Hasegawa H: Utility of a neonatal mouse model for studying coxsackievirus B2. 同上
- 15) Nakamura T, Arita M, Shimizu H: Development of direct detection method of polioviruses from environmental samples. 同上
- 16) Nishimura Y, McLaughlin N, Pan J, Goldstein S, Hafenstein S, Shimizu H, Winkler JD, Bergelson JM: The suramin derivative NF449 interacts with the 5-fold vertex of the EV71 capsid to prevent virus attachment to PSGL-1 and heparan sulfate. 同上
- 17) Ohashi H, Watashi K, Nakajima S, Kim S, Suzuki R, Aizaki H, Fukasawa M, Kamisuki S, Sugawara F, Ohtani N, Wakita T. Flutamide-mediated disruption of lipid droplets impairs the host permissiveness to hepatitis C virus production. 同上
- 18) Okamura H, Akahori Y, Kim S, Nio Y, Watashi K, Wakita T, Hijikata M. Egression of hepatitis B virus particles is promoted by long chain saturated fatty acid. 同上
- 19) Okutsu S, Ito K, Yoneda M, Angata K, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Tong S, Mizokami M, Narimatsu H. Investigation of mechanisms of interaction between host glycosylation system and hepatitis B virus replication system. 同上
- 20) Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Tajima S, Takasaki T, Takeyama H, Wakita T, Suzuki R. Bivalent vaccine platform based on Japanese encephalitis virus (JEV) elicit neutralizing antibodies against JEV and hepatitis C virus. 同上
- 21) Sakurai F, Yamamoto T, Mitani S, Takayama K, Tachibana M, Watashi K, Wakita T, Iijima S, Tanaka Y, Mizuguchi H. Human iPS-derived hepatocytes as an in vitro HBV infection model. 同上
- 22) Shiota T, Li TC, Yoshizaki S, Nishimura Y, Shimizu H, Shimojima M, Saijo M, Wakita T, Ishii K. The validation study of hepatitis E virus receptor candidate. 同上
- 23) Y Shimizu, Y Shirasago, M Kondoh, K Yagi, T Suzuki, T Wakita, K Hanada, M Fukasawa. Establishment of anti-occludin monoclonal antibodies that inhibit HCV infection in cell culture system. 同上

- 24) Suzuki R, Saga R, Fujimoto A, Watanabe N, Matsuda M, Hasegawa M, Watashi K, Aizaki H, Nakamura N, Konishi E, Kato T, Tajima S, Takasaki T, Takeyama H, Wakita T. Development of a novel vaccine platform based on Japanese encephalitis viruses. BMB 2015, 12月, 2015年, 神戸ポートアイランド (神戸)
- 25) M. Tasaka-Fujita, N Sugiyama, T Masaski, A Murayama, T Wakita, T Kato. Attenuation of MHC class I Expression by Intracellular Accumulation of HCV Core Protein. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場、(2015. 11.22-24)
- 26) Toyama M, Hamasaki T, Okamoto M, Watashi K, Wakita T, Baba M. Identification of novel pyrimidotriazinone derivatives as inhibitors of HBV replication. 同上
- 27) Tsukuda S, Watashi K, Hamada Y, Isogawa M, Iwamoto M, Suzuki R, Aizaki H, Kojima S, Sugiyama M, Saito A, Tanaka Y, Mizokami M, Wakita T. Identification of flavonoid derivative that directly acts on hepatitis B virus surface protein and inhibits viral entry. 同上
- 28) Yamada S, Kotani O, Iwata-Yoshikawa N, Hasegawa H, Shimizu H, Nagata N: The pathogenesis of a Saffold virus isolate from upper respiratory inflammation in a mouse model. 同上
- 29) Yamashita A, Tanaka T, Okuyama-Dobashi K, Kasai H, Watashi K, Wakita T, Toyama M, Baba M, Moriishi K. Metachromin A, sesquiterpene from marine sponge Dactylospongia metachromia, exerts anti-HBV activity via inhibition of HBV core promoter. 同上
- 30) Yasumoto J, Kasai H, Tanaka T, Watashi K, Wakita T, Yamashita A, Dobashi-Okuyama K, Moriishi K. Hepatitis B virus downregulates expression of CIDE-B and CIDE-C and impairs lipid droplet growth. 同上
- 31) Yokokawa H, Higashino A, Suzuki S, Suzuki T, Akari H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Neutralizing antibody induction by vaccination of cell culture-generated hepatitis C virus particles in non-human primate model. 第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会合同大会、平成27年12月、神戸
- 32) Yokokawa H, Higashino A, Suzuki S, Suzuki T, Akari H, Kato T, Ishii K, Wakita T. Vaccination of cell culture-generated hepatitis C virus particles induces neutralizing antibody in non-human primate model. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場、(2015. 11.22-24)
- 33) P YoungBin, R Todaka, K Haga, T Shimoike, S Fukushima, Y Someya, M Yokoyama, H Sato, F Kawai, P Sam-Yong : Functional Analysis of Human Norovirus RNA-dependent RNA Polymerase 同上
- 34) Zaitu T, Aovagi H, Fujimoto A, Matsuda M, Watanabe N, Watashi K, Suzuki R, Fukuhara T, Matsuura Y, Sakamaki Y, Ichinose S, Wake K, Suzuki T, Iijima H, Matsuura T, Tamura K, Wakita T, Aizaki H. Transfer hepatitis C virus from human liver cells to hepatic stellate cells. 同上
- 35) 浅部伸一, 加藤孝宣, 浅野岳晴, 吉田行雄, 中村郁夫. B型慢性患者におけるHBV抗原特異的CD4陽性T細胞の解析. 第51回日本肝臓学会総会、ホテル日航熊本、(2015. 5. 21-22)
- 36) アリ・ハッサン・フセイン, 渡士幸一, 茶山一彰, 加藤孝宣, 脇田隆字. The RNA exosome as an anti-viral agent. 平成27年度北海道大学遺伝子病制御研究所研究集会 感染・免疫・炎症・発癌. 札幌, 2015. 12. 18.
- 37) 有田峰太郎: PI4KBは、抗ピコルナウイルス化合物 oxoglucine および pachypodol (Ro 09-0179)の直接の標的である. 第25回抗ウイルス療法学会総会、東京, 2015.5.24
- 38) 石井孝司: 日本におけるA型肝炎の現状について、第11回日本小児消化管感染症研究会、平成27年2月、大阪

- 39) 石田豊和, 久保田智巳, 白土東子: ノロウイルスキャプシドタンパク質とルイス抗原との糖鎖認識: 計算科学による相互作用解析, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月, 徳島
- 40) 石田豊和, 久保田智巳, 白土東子: ノロウイルスキャプシドタンパク質と血液型糖鎖抗原との糖鎖認識機構, 第 18 回理論化学討論会, 2015 年 5 月, 大阪
- 41) 石田豊和, 久保田智巳, 白土東子: ノロウイルスキャプシドタンパク質の糖鎖認識における糖鎖構造依存性, 第 9 回分子科学討論会, 2015 年 9 月, 東京
- 42) 大場舞, 岡智一郎, 安藤隆幸, 荒畑沙織, 池ヶ谷朝香, 高木弘隆, 小郷尚久, 小和田和宏, 川森文彦, 浅井章良 抗ノロウイルス活性を有する低分子化合物の探索 日本薬学会第 136 年会. 2016. 3. 26-29. 横浜
- 43) 岡智一郎, 高木弘隆, 横山勝, 小島宏建, 岡部隆義, 長野哲雄, 佐藤裕徳 ネコカリシウイルスプロテアーゼの基質特徴を有する非ペプチド性低分子化合物の抗ウイルス活性 日本薬学会第 136 年会. 2016.3.26-29. 横浜
- 44) 岡智一郎: サポウイルスの新知見 ウイルス性下痢症研究会. 第 27 回学術集会. 福岡. 2015.11.21.
- 45) 片岡周子, Tran Thi Nguyen Hoa, 中村朋史, Nguyen Thi Hien Thanh, 清水博之: 2011 年と 2012 年の北部ベトナムにおける手足口病の流行状況第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡, 2015. 11. 22-24
- 46) 加藤孝宣, 松村卓哉, 井廻道夫. 抗菌ペプチド LL-37 による抗 HCV 作用. 第 51 回日本肝臓学会総会, ホテル日航熊本, (2015. 5. 21-22)
- 47) 加藤孝宣, 政木隆博, 脇田隆宇. C 型肝炎ウイルス ISDR 変異によるインターフェロン耐性発現機序の解析. 同上
- 48) 加藤孝宣, 藤田めぐみ, 杉山奈央, 政木隆博, 村山麻子, 脇田隆宇. Attenuation of MHC class I expression by intracellular accumulation of HCV core protein. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡国際会議場, (2015. 11.22-24)
- 49) 金子学, 渡土幸一, 松永大輝, 紙透伸治, 岩本将土, 河合文啓, 鈴木亮介, 相崎英樹, 朴三用, 菅原二三男, 脇田隆宇. 新規真菌二次代謝産物 SF177 の B 型肝炎ウイルス感染阻害活性および NTCP トランスポーター阻害活性の同定, 第 25 回抗ウイルス療法研究会総会, 国立感染症研究所, (2015. 5. 22-24)
- 50) 清原知子, 石井孝司, 脇田隆宇: 本邦における B 型肝炎流行状況の調査, 第 51 回日本肝臓学会総会, 平成 27 年 5 月, 熊本
- 51) 久保田智巳, 伊藤浩美, 成松久, 石田豊和, 白土東子: ノロウイルスキャプシドタンパク質と血液型糖鎖抗原との相互作用の結晶学的解析, 第 15 回日本蛋白質科学会年会, 2015 年 6 月, 徳島
- 52) 佐藤精一, 李凱, 亀山武志, 林隆也, 石田雄二, 村上周子, 渡邊綱正, 飯島沙幸, 櫻井遊, 渡土幸一, 堤進, 佐藤悠介, 秋田英万, 脇田隆宇, Rice Cm, 原島秀吉, 小原道法, 田中靖人, 高岡晃教. B 型肝炎ウイルスの感染に対する RIG-I を介した自然免疫応答機構. 第 25 回抗ウイルス療法学会総会, 5 月, 2015 年, 国立感染症研究所 (東京).
- 53) 佐藤弘, 多屋馨子, 大石和徳, 清水博之: 不活化ポリオワクチン導入によるポリオの予防接種状況および抗体保有状況の推移について (2012~2014 年度感染症流行予測調査より) 第 47 回日本小児感染症学会学術集会, 福島, 2015.10.31-11.1
- 54) 清水博之. ポリオウイルス病原体管理に関する WHO 行動計画(GAP III)と今後の課題. 第 15 回日本バイオセーフティ学会総会, 東京, 2015. 9. 17.
- 55) 下池貴志, In vitro template-specific RNA transcription by Norovirus RNA-dependent RNA Polymerase 第 63 回日本ウイルス学会学術集会, 福岡国際会議場, (2015. 11.22-24)
- 56) 鈴木亮介. 日本脳炎ウイルスを利用した新規ワクチンプラットフォームの開発. 第 50 回日本脳炎ウイルス生態学研究会, 京都, 2015 年 5 月 15-16

- 日.
- 57) 鈴木亮介、嵯峨涼平、藤本陽、渡邊則幸、松田麻未. ワクチン抗原をデザインする：フラビウイルス粒子を利用した二価ワクチン抗原の開発. 第1回デザイン生命工学研究会、横浜、2016年3月8日.
- 58) 外山政明、濱崎隆之、岡本実佳、渡士幸一、脇田隆宇、Ashoke Sharon、馬場昌範. 新規核酸誘導体 7-deazaneplanocin A 誘導体の抗 HBV 効果について. 第25回抗ウイルス療法学会総会, 5月, 2015年, 国立感染症研究所 (東京)
- 59) 新田沙由梨、村山麻子、藤田めぐみ、山田典栄、政木隆博、脇田隆宇、朝比奈靖浩、加藤孝宣. HCV 感染培養系を用いた Daclatasvir 耐性変異株の抗 HCV 薬に対する薬剤感受性の評価. 第51回日本肝臓学会総会、ホテル日航熊本、(2015. 5. 21-22)
- 60) 福島慎二、清原知子、石井孝司、中野貴司、濱田篤郎: A 型肝炎ワクチン(エイムゲン®と HAVRIX®) の互換性に関する研究、第18回日本渡航医学会学術集会、平成27年7月、名古屋
- 61) 深澤 征義、清水 芳実、白砂 圭崇、近藤 昌夫、八木 清仁、鈴木 哲朗、脇田 隆宇、花田 賢太郎、Occludin 細胞外ドメインに対するモノクローナル抗体の樹立と本抗体による C 型肝炎ウイルス感染阻害、第38回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、(2015. 12.1-4)
- 62) 藤井克樹: ロタウイルスの分子疫学とロタウイルスワクチン (シンポジウム) 第63回日本感染症学会東日本地方会総会学術集会・第61回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会 (東京) 2014年10月29-31日
- 63) 政木隆博、加藤孝宣、脇田隆宇. microRNA-122 による C 型肝炎ウイルスゲノム複製の新規制御機構. 第51回日本肝臓学会総会、ホテル日航熊本、(2015. 5. 21-22)
- 64) 松浦知和、松本喜弘、永森収志、渡士幸一、金井好克、小嶋聡一、脇田隆宇、相崎英樹. ヒト肝癌細胞 FLC4 における B 型肝炎ウイルスレセプター
- NTCP の発現と誘導に関する検討. 同上
- 65) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆宇、加藤孝宣. Reconstitution of the Entire Hepatitis C virus Life Cycle in Monkey Kidney Derived Cell Line. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡国際会議場、(2015. 11.22-24)
- 66) 村山麻子、杉山奈央、脇田隆宇、加藤孝宣. Replication and Infectious Virus Production of HCV in Vero Cells. 第38回日本分子生物学会年会. 神戸, 2015. 12. 1-4.
- 67) 村山麻子、脇田隆宇、加藤孝宣. サル腎臓由来のペロ細胞を用いた C 型肝炎ウイルス感染複製系の樹立. 第51回日本肝臓学会総会、熊本、2015. 5. 21-22.
- 68) 山下篤哉、田中智久、葛西宏威、渡士幸一、脇田隆宇、外山政明、馬場昌範、前川伸哉、榎本信幸、玉城麻友美、田中淳一、森石恆司. カイメン由来化合物 metachromin A 及びその類縁化合物の抗 HBV 活性の検討. 第25回抗ウイルス療法学会総会, 5月, 2015年, 国立感染症研究所 (東京)
- 69) 山下篤哉、田中智久、土橋香織、葛西宏威、渡士幸一、脇田隆宇、外山政明、馬場昌範、前川伸哉、榎本信幸、玉城麻友美、田中淳一、森石恆司. 海綿由来セキステルペン系化合物 metachromin A の B 型肝炎ウイルスコアプロモーター抑制活性を介した抗ウイルス活性. BMB 2015, 12月, 2015年, 神戸ポートアイランド (神戸)
- 70) 山田典栄、加藤孝宣、四柳 宏. B 型急性肝炎症例におけるワクチンエスケープ変異. 第51回日本肝臓学会総会. 熊本, 2015. 5. 21-22.
- 71) 山田典栄、四柳 宏、加藤孝宣. エンテカビル耐性例、反応不良例における HBV 株の薬剤耐性機序の検討. 同上
- 72) 山中敦史、モイメンリン、松田麻未、高崎智彦、倉根一郎、鈴木亮介、小西英二. 国外の昆虫媒介性フラビウイルス感染症の侵入に備えた診断用抗原の作製. 第56回日本熱帯医学会大会、大阪、2015年12月4-6日.

## ウイルス第二部

- 73) 脇田隆宇、肝炎ウイルス研究：B から C、そして C から B、第 51 回日本肝臓学会総会、ホテル日航熊本、(2015. 5. 21-22) サテライトセミナー
- 74) 脇田隆宇、C 型肝炎ウイルスの増殖機構と増殖系の開発、第 80 回日本インターフェロン・サイトカイン学会大会、東京工業大学、(2015. 7. 17-18)
- 75) 渡土幸一、C 型肝炎治療薬の個性を探る ～多剤併用から費用対効果の考察まで～. ウイルス感染現象における宿主細胞コンピテンシーの分子基盤 第 2 回若手研究会、7 月、2015 年、マホロバマイズ三浦 (三浦)
- 76) 渡土幸一、ウイルス感染増殖系を基盤とした天然化合物の新規生理機能の解析. 天然物ケミカルバイオロジー 分子標的と活性制御 第 8 回公開シンポジウム、6 月、2015 年、東北大学片平キャンパス (仙台)
- 77) 渡土幸一、九十田千子、金子学、松永大輝、紙透伸治、齊藤安貴子、鈴木亮介、相崎英樹、杉山真也、溝上雅史、菅原二三男、田中靖人、脇田隆宇、B 型肝炎ウイルスに対する直接標的薬 proanthocyanidin および宿主標的薬 vanitaracin の同定および感染阻害機構の解析. 第 25 回抗ウイルス療法学会総会、5 月、2015 年、国立感染症研究所 (東京)
- 78) 渡土幸一、中嶋翔、紙透伸治、Izaguirre-Carbonell J、Kwon Atj、鈴木治和、九十田千子、岡田麻衣子、鈴木亮介、相崎英樹、菅原二三男、脇田隆宇、Neoechinulin B の liver X receptor 転写阻害効果の同定およびそれによる C 型肝炎ウイルス複製制御機構の解析. 同上
- III. その他
- 1) 片山和彦 平成 28 年 3 月 25 日 新興再興 J-GRID 合同シンポジウム (AMED 主催) 感染症研究連携のフロンティア JGRID との連携による下痢症ウイルス分子疫学プロジェクト (国立感染症研究所戸山庁舎共用第一会議室)
- 2) 片山和彦 平成 28 年 2 月 6 日 感染症と闘う：感染症を科学する (東京農工大学工学部(博物館))
- 3) 片山和彦 平成 28 年 2 月 20 日 食品衛生管理セミナー金谷 新型ノロウイルスの流行について (島田市金谷夢づくり会館)
- 4) 片山和彦 平成 28 年 2 月 19 日 日本環境感染症学会シンポジウム ノロウイルスの世界的流行は何故起こっているのか (京都国際会館グランドプリンスホテル京都 1F ロイヤルルーム)
- 5) 片山和彦 平成 28 年 2 月 13 日 第 16 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム ノロウイルスとワクチン (東京医科歯科大学歯学部特別講堂)
- 6) 片山和彦 平成 28 年 2 月 12 日 日本感染性腸炎学会 特別講演 食中毒の新しいトレンド、疫学情報を中心に ノロウイルス (国立感染症研究所戸山庁舎共用第一会議室)
- 7) 片山和彦 平成 28 年 1 月 27 日 国立感染症研究所・AMED 共催 感染制御セミナー 下痢症ウイルスの分子疫学(ノロウイルス・ロタウイルス) (国立感染症研究所戸山庁舎共用第一会議室)
- 8) 片山和彦 平成 28 年 1 月 19 日 厚生労働省健康局記者勉強会(第二回) 講師 今話題の感染症～ノロウイルス、エンテロウイルス D68 厚生労働省会見室
- 9) 片山和彦 平成 27 年 9 月 25 日 第 87 回日本遺伝学会大会 ロタウイルス構造タンパク質の分子間インタラクションが規定するゲノムリアソートメント (東北大学)
- 10) 片山和彦 平成 27 年 12 月 18 日 さいたま市サイエンスカフェ さいたま市保健福祉局保健部食品安全推進課食品安全係主催 講師 ホントに知ってる？ノロウイルスのこと(ノロウイルス都市伝説) (浦和コミュニティーセンター第 13 回議室)
- 11) 片山和彦 平成 27 年 11 月 27 日 川崎市健康安全研究所講演会 ノロウイルス研究のトピックス (川崎市健康安全研究所講堂)

- 12) 片山和彦 平成 27 年 11 月 19 日 公立昭和病院  
院内感染対策講習会 ノロウイルス感染症 (公  
立昭和病院ホール
- 13) 片山和彦 平成 27 年 11 月 15 日 第 8 回日本旅  
行医学会東京大会ランチョンセミナー 知ってい  
るようで知らないノロウイルス (東医保険会館)
- 14) 片山和彦 平成 27 年 10 月 20 日 郡山市保健所、  
郡山職員衛生協会主催 平成 27 年度ノロウイル  
ス対策講習会 “ノロウイルス食中毒発生防止対  
策及び感染症発生防止対策について” (ビッグ  
パレット福島)
- 15) 清水博之: 世界ポリオ根絶計画とポリオワクチ  
ン. 知の市場・市民連携セミナー. 東京、2015. 12. 15
- 16) 清水博之: ポリオウイルス病原体管理. 平成 27 年  
度 希少感染症診断技術研修会、東京、2016. 2. 17
- 17) 清水博之: エンテロウイルス感染症. ラジオ  
NIKKEI 医学情報番組「杏林シンポジア」、東京、  
2015. 9. 3. 収録
- 18) 清水博之: エンテロウイルス感染症. ラジオ  
NIKKEI ドクターサロン. 東京、2015. 10. 9. 収録
- 19) 清水博之: エンテロウイルス D68 (EV-D68) 感染症.  
平成 27 年度 希少感染症診断技術研修会、東京、  
2016. 2. 17.
- 20) 清水博之: エンテロウイルス D68 (EV-D68) 感染症.  
第 2 回健康局記者勉強会厚生労働省、東京、2016.  
1. 19.
- 21) 清水博之: エンテロウイルス D68 (EV-D68) 感染症.  
第 70 回感染・免疫懇話会講演会、葛飾区医師会  
館、2016. 2. 13.
- 22) 吉田弘 「病原体検査指針 (仮称) について」 衛生  
微生物技術協議会第 36 回研究会 仙台市  
2015. 7. 23-24.
- 23) 吉田弘 「病原体検査の信頼性保証」 H27 年度地全  
協関東甲信静支部細菌研究部会、静岡、2016.  
2. 9.
- 24) 吉田弘 「感染症法改正に伴う病原体検査の信頼性  
確保に関わる検討状況について」平成 27 年度地  
域保健総合推進事業 地全協中国四国支部地域専  
門家会議、岡山市 2015. 9. 10.
- 25) 吉田弘 「感染症法改正に伴う病原体サーベイラン  
スと信頼性確保について」平成 27 年度地方衛生  
研究所全国協議会近畿支部ウイルス部会研究会、  
神戸市、2015. 10. 2.
- 26) 吉田弘 「感染症法改正に伴う病原体サーベイラン  
スと信頼性確保について」平成 27 年度地域保健  
総合推進事業 地全協東海北陸支部地域専門家会  
議、名古屋市、2015. 10. 8.
- 27) 吉田弘 「感染症法改正に伴う地方衛生研究所にお  
ける検査精度管理について」平成 27 年度地域保  
健総合推進事業 地全協関東甲信静支部地域専門  
家会議、甲府市、2015. 10. 7.
- 28) 吉田弘 「感染症法改正に係る今後の病原体サーベ  
イランス検査と信頼性確保について」平成 27 年  
度地域保健総合推進事業 北海道・東北・新潟 ブ  
ロック地域専門家会議、新潟市、2015. 10. 1.
- 29) 吉田弘 「感染症法改正に係る今後の病原体サーベ  
イランス検査と信頼性確保について」平成 27 年  
度技術懇話会 東京都健康安全健康センター、東  
京、2015. 12. 9.
- 30) 吉田弘 「感染症法改正に係る今後の病原体サーベ  
イランス検査と信頼性確保について」平成 27 年  
度地域保健総合推進事業 地全協九州支部地域専  
門家会議、佐賀市、2015. 10. 22.
- 31) 吉田弘 「ポリオの環境水サーベイランス」平成  
27 年度感染症危機管理研修会、戸山庁舎、  
10. 14-15.
- 32) 吉田弘: 「感染症法一部改正に伴う病原体検査の  
信頼性確保に関わる検討状況について」神奈川県  
衛生研究所 平成 27 年度第 1 回公衆衛生専門技  
術研修 2015. 5. 26.